

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

P C T



## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
〔P C T 1 8 条、P C T 規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 97-016-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP97/00299	国際出願日 (日.月.年) 07.02.97	優先日 (日.月.年)
出願人 (氏名又は名称) 塩野義製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

2. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

3. ☒ この国際出願は、ヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。

☒ この国際出願と共に提出されたもの

☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの

☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない

☐ この国際調査機関が書換えたもの

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
第      図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 15/12, C07K 14/715, C12N 5/10, C12P 21/02, C12P 21/08, C07K 16/28, A61K 38/18, A61K 38/19, G01N 33/577

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 15/12, C07K 14/715, C12N 5/10, C12P 21/02, C12P 21/08, C07K 16/28, A61K 38/18, A61K 38/19, G01N 33/577

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS, WPI, BIOSIS PREVIEWS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	NAGASAWA TAKASHI et al, 「MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A MURINE PRE-B-CELL GROWTH-STIMULATING FACTOR . . .」 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93(25), 14726-14729	1-23
X	HEESEN MICHAEL et al, 「CLONING OF THE MOUSE FUSIN GENE, HOMOLOG TO A HUMAN HIV-1 CO-FACTOR」 J. Immunol., 1996, 157(12), 5455-5460	1-23

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.04.97

国際調査報告の発送日

22.04.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

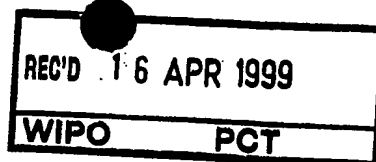
4 B

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**




PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 97-016-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP97/00299	国際出願日 (日.月.年) 07.02.97	優先日 (日.月.年)
国際特許分類(IPC) Int. Cl <sup>8</sup> C12N 15/12, C07K 14/715, C12N 5/10, C12P 21/02, C12P 21/08, C07K 16/28, A61K 38/18, A61K 38/19, G01N 33/577		
出願人(氏名又は名称) 塩野義製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u>                    </u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎  II <input type="checkbox"/> 優先権  III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成  IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如  V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明  VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献  VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備  VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 15.07.98	国際予備審査報告を作成した日 31.03.99	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員)  新見 浩一 	4B 9162  電話番号 03-3581-1101 内線 3448

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)。

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☒ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-5, 10-23	有
	請求の範囲	6-9	無
進歩性(IS)	請求の範囲	15-23	有
	請求の範囲	1-14	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-23	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

## ・請求の範囲6-9, 14に対して

配列表の配列番号: 17のアミノ酸配列は、国際調査報告で引用された文献1及び2に記載されているので、新規性を有さない。また、文献1及び2に記載された蛋白質に対するモノクローナル抗体を調製することは、当業者にとって容易である。

## ・請求の範囲1-5に対して

アミノ酸配列が公知の蛋白質をコードするDNAを得ることは、当業者であれば容易になし得ることと認められる。

## ・請求の範囲10-13に対して

文献1及び2に記載された蛋白質をコードするDNAを得、該DNAをベクターに導入し、該ベクターを宿主細胞に導入し、該宿主細胞を培養して蛋白質を製造することは、当業者であれば容易になし得ることと認められる。

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C07K 14/715, C12N 5/10, C12P 21/02, 21/08, C07K 16/28, A61K 38/18, 38/19, G01N 33/577</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/35035</p> <p>(43) 国際公開日 1998年8月13日(13.08.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00299</p> <p>(22) 国際出願日 1997年2月7日(07.02.97)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 塩野義製薬株式会社(SHIONOGI &amp; CO., LTD.)(JP/JP) 〒541 大阪府大阪市中央区道修町三丁目1番8号 Osaka, (JP)</p> <p>(71) 出願人 ; および</p> <p>(72) 発明者 岸本忠三(KISHIMOTO, Tadamitsu)(JP/JP) 〒584 大阪府富田林市中野三丁目5-31 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 長沢丘司(NAGASAWA, Takashi)(JP/JP) 〒590-01 大阪府堺市赤坂台一丁目50番地8号 Osaka, (JP)</p> <p>橋 和延(TACHIBANA, Kazunobu)(JP/JP) 〒591 大阪府堺市南花田町46-5-205 Osaka, (JP)</p> <p>飯笹 久(IIZASA, Hisashi)(JP/JP) 〒920 石川県金沢市石引三丁目5-17-1C Ishikawa, (JP)</p> <p>吉田進昭(YOSHIDA, Nobuaki)(JP/JP) 〒639-02 奈良県香芝市穴虫1401 Nara, (JP)</p> <p>中島俊洋(NAKAJIMA, Toshihiro)(JP/JP) 〒560 大阪府豊中市長興寺北三丁目13-31-303 Osaka, (JP)</p>		<p>義江 修(YOSHIE, Osamu)(JP/JP) 〒651-14 兵庫県西宮市北六甲台五丁目22-17 Hyogo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 細田芳徳(HOSODA, Yoshinori) 〒540 大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大手前M2ビル 細田国際特許事務所 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: NOVEL MOUSE CXCL12 CHEMOKINE RECEPTOR</p> <p>(54) 発明の名称 新規マウスCXCL12ケモカインレセプター</p> <p>(57) Abstract A DNA encoding a polypeptide comprising the whole amino acid sequence described in SEQ. ID NO: 17 of the Sequence Listing or a part of the same or a polypeptide containing the above polypeptide which has a receptor activity capable of binding to mouse PBSF/SDF-1; a polypeptide encoded by this DNA and having a receptor activity capable of binding to mouse PBSF/SDF-1; cells expressing this polypeptide and human CD4 protein; and a method for screening an AIDS onset inhibitor, an HIV-1 infection inhibitor, etc. which comprises using the above-mentioned cells. Thus the invention provides a novel mouse CXCL12 chemokine receptor gene which is useful in studies on a remedy for AIDS or the mode of action in the infection with HIV-1, a method for screening an HIV-1 infection inhibitor, etc.</p>		

(57) 要約

本発明は、配列表の配列番号：17に記載のアミノ酸配列の全部又は一部からなるポリペプチド、又は該ポリペプチドを含むポリペプチドであって、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドをコードするDNA；該DNAによりコードされるポリペプチドであって、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチド；該ポリペプチド及びヒトCD4タンパク質を発現する細胞；並びに該細胞を用いることを特徴とするAIDS発症阻害剤やHIV-1感染阻害剤等をスクリーニングする方法に関する。本発明により、AIDSの治療薬及びHIV-1の感染の作用機序等の研究に有用な、新規なマウスCXCKemoカインレセプター遺伝子や、HIV-1感染阻害剤のスクリーニング方法等が提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	NZ	ニュージーランド
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SD	スーダン
AT	オーストリア	GB	英国	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	GE	ジョージア	MC	モナコ	SI	スロベニア
AZ	アゼルバイジャン	GG	ガブリア	MD	モルドバ	SK	スロバキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GM	ギニア	MG	マダガスカル	SS	スーダン
BB	バルバドス	GN	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア共和国	ST	セント・ペール・ミケロン
BE	ベルギー	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャド
BG	ブルガリア	GU	グアム	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	DE	ドイツ	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CA	カナダ	IN	インド	NE	ネパール	US	米国
CC	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	NL	オランダ	UY	ウルグアイ
CG	コンゴ	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ベトナム
CH	スイス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボワール	KR	韓国	PL	ポーランド		
CM	カメルーン	RU	ロシア	PT	ポルトガル		
CN	中国	SA	サウジアラビア	RO	ルーマニア		
CO	コロンビア	SC	スウェーデン	SE	スウェーデン		
CZ	チェコ	SI	スロベニア	SK	スロバキア		
DE	ドイツ	LL	リベリア	SL	シエラレオネ		
DK	デンマーク	LR	リベリア				
EE	エストニア	LS	レソト				

## 明 細 書

## 新規マウスCXCケモカインレセプター

## 技術分野

本発明は、新規マウスCXCケモカインレセプター、及びマウスケモカインレセプター遺伝子に関する。さらに詳しくは、該遺伝子にコードされるポリペプチド、該遺伝子を含有する発現ベクター、該発現ベクターを導入した形質転換体、前記ポリペプチドに対する単クローン抗体に関する。さらには前記形質転換体を用いる前記ポリペプチドの生産方法に関する。さらには、ケモカインのアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法、及びAIDS発症阻害剤又はHIV-1感染阻害剤のスクリーニング方法に関する。

## 背景技術

細菌またはウイルスによる感染、物理的または化学的な外傷、自己免疫疾患、アレルギー疾患などが原因で組織障害が起こると、発赤、浮腫、発熱、疼痛などの兆候を伴う炎症反応が惹起され、炎症局所に末梢血白血球の集積および浸潤が観察される。白血球は、疾患によって炎症部位に浸出する種類が異なっている。通常の細菌感染、免疫複合体の沈着、外傷などの急性炎症では主に好中球が、結核菌感染、チフス菌感染、および遅延型過敏症では主に単球が、ウイルス感染では主にリンパ球が集積および浸潤し、そして好酸球および好塩基球は即時型アレルギーまたは寄生虫感染に伴って浸出する (Baggiolini, M. ら、Immunol. Today, 15, 127-133 (1994)。近年、遊走する白血球に対してある程度の選択性を有し、特徴的な4つのシステイン残基を有するポリペプチドの走化因子が発見された。これらは、アミノ酸配列に相同性があり、生物活性にも関連性のあるファミリーであるため、ケモカイン (Chemokine; Chemoattractant and cytokine activit

y)と命名されている(Lindley, I. J. D. ら、Immunol. Today, 14-24(1993))。

ケモカインの4つのシステイン残基は、第1と第3の残基間および第2と第4の残基間でそれぞれジスルフィド結合している。第1と第2とのシステイン残基間に別のアミノ酸を1つ含むか否かで生物活性に特徴が認められるので、それぞれのサブファミリーをCXCケモカインおよびCCケモカインと呼んで区別している(Baggiolini, M. ら、Adv. Immunol., 55, 97-179(1994))。

これまでに発見されたCXCケモカインは、PBSF/SDF-1、IL-8(Yoshimura, T. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9233-9237(1987)), NAP-2(Walz, A. ら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 159, 969-975(1989)), NAP-4, GRO  $\alpha$  (Richmond, A. ら、J. Cell. Biochem., 36, 185-198(1988)), GRO  $\beta$  (Haskill, S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 77732-77736(1990)), GRO  $\gamma$  (Haskill, S. ら、(1990) 前出)、GCP-2(Proost, P. ら、J. Immunol., 150, 1000-1010(1993)), ENA-78(Wayz, A. ら、J. Exp. Med., 174, 1355-1362(1991)), PF-4(Deuel, T. F. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 2256-2258(1977))、ヒトCXCR4/fusin/HUMSTSR(Feng, Y. ら、Science, 272, 872-877(1996))、及びIP-10(Dewald, B. ら、Immunol. Lett., 32, 81-84(1992))である。

そしてCCケモカインは、MCP-1(Yoshimura, T. ら、J. Immunol., 142, 1956-1962(1989)), MCP-2(Chang, H. C. ら、Int. Immunol., 1, 388-397(1989)), MCP-3(Van Damme, J. ら、J. Exp. Med., 176, 59-65(1992)), MIP-1  $\alpha$  (Obaku, K. ら、J. Biochem., 99, 885-894(1986)), MIP-1  $\beta$  (Lipes, M. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 9704-9708(1988)), RANTES(Schall, T. ら、J. Immunol., 141, 1018-1025(1988)), I-309(Miller, M. D. ら、J. Immunol., 143, 2907-2916(1989)) およびエオタキシン(Jose, P. ら、J. Exp. Med., 179, 881-887(1994)) である。

ほとんどのCXCケモカインは好中球を遊走させて単球を遊走させない。また、ほとんどのCCケモカインは単球を遊走させて好中球を遊走させない。また、



他の白血球である好酸球、好塩基球、リンパ球については、それぞれ一部の C X C および C C ケモカインに遊走活性が報告されている。ヒトリンパ球の遊走活性としては、C C ケモカインの RANTES、MIP-1  $\alpha$ 、MCP-1、そして C X C ケモカインである IL-8 において認められているが、いずれもリンパ球に特異的な走化因子ではない。

マウス PBSF/SDF-1 は、元来マウス骨髄間質細胞株 PA6 より分泌されるマウス B 前駆細胞増殖促進因子として同定された C X C ケモカインであり、そのアミノ酸配列も報告されている (図 1) (Nagasawa, T. ら Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91, 2305-2309 (1994))。また最近ヒト T リンパ球に対しても強い遊走活性をもつことが明らかとなっている (Bleul, C. ら, J. Exp. Med., 184, 1101-1110)。

ケモカインのレセプターについても、種々の研究が行われており、IL-8 に特異的なレセプターである IL-8RA, IL-8 およびその他の C X C ケモカインのレセプターである IL-8RB, MIP-1  $\alpha$  および RANTES に特異的なレセプターである CC CKR1, MCP-1 に特異的なレセプターである CC CKR2A、MCP-1 および MCP-3 に特異的な CC CKR2B, エオタキシン、MCP-3、RANTES に特異的なレセプターである CC CKR3 (Combadiere, C. ら, J. Biol., 270, 16491-16494 (1995)), また MIP-1  $\alpha$ , MIP-1  $\beta$ , RANTES に特異的なレセプターである CC CKR5 が報告されている。また、最近ヒト C X C ケモカインである SDF-1 レセプターとして CXCR4/fusin/HUMTSR が同定された。

また、上記のケモカインレセプターのうち CC CKR5, CC CKR2B, CC CKR3 および CXCR4/fusin/HUMTSR は細胞膜上に存在するタンパク質である CD4 と協調して HIV-1 のレセプターとしての作用をもつこと、さらにそれぞれのレセプターのリガンドによりそれらのレセプターを介する HIV-1 の感染が阻害されることが明らかとなっている。

AIDS の病因ウイルスである HIV-1 の感染と AIDS の発症には性質の異なる 2 種の HIV-1 が関与している。主に単球、マクロファージ、T リンパ球に感染する単球

指向性HIV-1 は感染および潜伏感染期間中のヒト体内でのウイルスの増殖に関与し、主にTリンパ球に感染するT細胞株指向性HIV-1はTリンパ球数の減少とAIDSの発症に関与している。上記の2種のHIV-1 が細胞に感染するには、2つのレセプターが必要である。1つは細胞膜タンパク質の一種であるCD4 タンパク質であり、上記の2種のHIV-1 で共通するレセプターである。もう1つはCD4 タンパク質と協調してレセプターとしての活性をもつcoreceptorと呼ばれるタンパク質であり、上記の2種のHIV-1 のそれぞれに特異的なレセプターである。

最近、単球指向性HIV-1の主なcoreceptorはCCケモカインレセプターであるCC CKR 5であり、T細胞株指向性HIV-1のcoreceptorはCXCケモカインレセプターであるヒトCXCR4/fusin/HUMSTRであることが明らかとなった。更に、CC CKR 5のリガンドであるMIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESで単球指向性HIV-1の感染が、ヒトCXCR4/fusin/HUMSTRのリガンドであるヒトPBSF/SDF-1でT細胞株指向性HIV-1の感染がそれぞれ阻害される事が明らかとなり、上記のケモカインレセプターがHIV-1感染阻害剤の標的となりうる事が示唆された。

一方、T細胞株指向性HIV-1の感染にヒトCXCR4/fusin/HUMSTRのどのドメイン必要であるかは、現在のところ同定されていない。CXCケモカインレセプターであるヒトCXCR4/fusin/HUMSTRは7回膜貫通型レセプターであり、4つの細胞外ドメインにより形成される立体構造がリガンドまたはHIV-1との結合に重要であると考えられる。ヒトCXCR4/fusin/HUMSTRの機能ドメインを同定するにはレセプターとしての立体構造が保たれるようなCXCR4/fusin/HUMSTR変異体を作製する事が必要である。ヒトCXCR4/fusin/HUMSTRの機能ドメインを同定することは、HIV-1感染阻害剤の開発に極めて有用である。

また、HIV-1の種特異性の原因となるメカニズムを解明する事は、ウイルスの感染に必要な細胞内因子を明らかにすると同様、HIV-1感染のモデル動物を開発するために重要である。マウスは、扱いやすく、低コストで、性質が詳細に明

らかとなっている優れた実験動物であるが、HIV-1 に感染するという報告はない。

マウス細胞にはHIV-1 ウィルス感染に関していくつかの障壁が存在している。最初の障壁は、マウス細胞へのウィルスの結合の段階に存在する。ヒト CD4はHIV-1 に結合するが、マウスCD4 はHIV-1 に結合しない。しかし、これまでの研究から、in vitroにおいてT 細胞株を含むマウス細胞株の細胞表面にヒト CD4を発現させると、HIVの細胞への吸着は起こるがエントリは起こらない事が明らかになっている。この結果から、ヒト CD4を発現するマウス細胞はウィルスのエントリを支持しない事が明らかとなり、CD4以外にも（ウィルスのエントリの時に起こる）膜融合に必要で、かつヒト特異的な受容体が存在しており、その分子はマウス細胞には欠如している事が示唆されていた。

HIV-1 は株により CD4陽性細胞に対する感染能力に差異が認められる。ある株は単球に感染するため単球或いはマクロファージ指向性株（M-tropic）に分類され、その他の株はT 細胞株に感染するためT 細胞株指向性株（T-tropic）に分類されている。

HIV-1 感染が進行するに従って、感染初期に多く認められる単球指向性のウィルスは、T細胞株指向性のウィルスに置き換わっていく。1996年に、7回膜貫通型でG蛋白質結合性受容体であるCXCR4/fusin がヒト CD4陽性細胞へのT 細胞株指向性 HIV-1のエントリに必須であることが示された。この結果は、ウィルスエントリの受容体としての機能に関してCXCR4 に種特異性があるかどうかを検討する事を本発明者らに促した。

#### 発明の開示

本発明者らは、CXCケモカインの一種のマウスPBSF/SDF-1の受容体としてマウス CXCR4を単離し、それがヒト CXCR4とアミノ酸配列が90%一致している事をここに明らかにした。本発明者らは、ヒト CD4とマウス CXCR4をトランスフェク

トした細胞を樹立し、HIV-1の受容体であるヒトCXCR4 がマウス細胞に存在するHIV-1 エントリに対する障壁であるかどうかを検討した。

したがって本発明の目的は、AIDSの治療薬及びHIV-1 の感染の作用機序等の研究に有用な、新規なマウスCXCケモカインレセプター遺伝子、該遺伝子にコードされるポリペプチド、該遺伝子の発現ベクター、該発現ベクターを有する形質転換体、該ポリペプチドに対する単クローン抗体、該ポリペプチドの生産方法、さらには該ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストの、及びHIV-1 感染阻害剤のスクリーニング方法を提供することにある。

そこで本発明者らは前記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、マウスPBSF/SDF-1依存的に増殖が促進されるマウスB前駆細胞株DW34より新規マウスケモカインレセプター遺伝子のクローニングに成功した。さらに、マウスCXCR4 とヒトCD4細胞を発現する細胞はT細胞株指向性 HIV-1株由来のenv 蛋白質を発現する細胞と融合する事、また、それらの細胞はT細胞株指向性 HIV-1株に感染する事を見出した。これらの結果は、CXCR4がマウス細胞に存在するT細胞株指向性 HIV-1のエントリに対する種特異的な障壁ではないと結論付けられるものである。また、env 領域もしくはV3 領域を単球指向性HIV-1 のものに置換したT細胞株指向性 HIV-1のキメラウイルスクローンは、マウスCXCR4 とヒトCD4細胞を発現する細胞に感染しない事からHIV-1 のエンベロップ蛋白質のV3ループがマウスCXCR4を介するHIV-1のエントリーに必要である事を明らかにした。かかる知見に基づいて、本発明を完成させた。

即ち、本発明の要旨は、

(1) 配列表の配列番号：17に記載のアミノ酸配列の全部又は一部からなるポリペプチド、又は該ポリペプチドを含むポリペプチドであって、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

(2) 配列表の配列番号：17に記載のアミノ酸配列の全部又は一部のアミ

ノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも一つが生じ、かつマウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

〔3〕 配列表の配列番号：1に記載の塩基配列の全部又は一部からなるDNA、又は該DNAを含むDNAであって、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

〔4〕 配列表の配列番号：1に記載の塩基配列の全部又は一部のDNA、又は該DNAを含むDNAであって、1以上の塩基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも一つが生じ、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

〔5〕 前記〔1〕～〔4〕いずれか記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

〔6〕 前記〔1〕～〔5〕いずれか記載のDNAによりコードされるポリペプチドであって、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチド、

〔7〕 配列表の配列番号：17に記載のアミノ酸配列の全部又は一部からなるポリペプチド、又は該ポリペプチドを含むポリペプチドであって、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチド、

〔8〕 配列表の配列番号：17に記載のアミノ酸配列の全部又は一部のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも一つが生じ、かつマウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチド、

〔9〕 マウスB前駆細胞株DW34に由来する、前記〔6〕～〔8〕いずれか記載のポリペプチド、

〔10〕 前記〔1〕～〔5〕いずれか記載のDNAを含む発現ベクター、

〔１１〕 前記〔１０〕記載の発現ベクターを宿主に導入して得られる形質転換体、

〔１２〕 宿主が哺乳類細胞株である前記〔１１〕記載の形質転換体、

〔１３〕 前記〔１１〕又は〔１２〕記載の形質転換体を、前記〔１０〕記載の発現ベクターの発現可能な条件下で培養することを特徴とする、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドの生産方法、

〔１４〕 前記〔６〕～〔９〕いずれか記載のポリペプチドに対する単クローン抗体、

---

〔１５〕 マウスPBSF/SDF-1を含有し、AIDS発症阻害剤又はHIV-1感染阻害剤として用いられる医薬組成物、

〔１６〕 前記〔６〕～〔９〕いずれか記載のポリペプチド及びヒトCD4タンパク質を発現する細胞、

〔１７〕 (a) 前記〔６〕～〔９〕いずれか記載のポリペプチドを発現する細胞又は前記〔１６〕記載の細胞；ヒトT細胞株指向性HIV-1；及びスクリーニングの対象となる物質を混合してインキュベートを行う工程、及び

(b) 該細胞における HIV-1の局在性を分析する工程、  
を含んでなることを特徴とする、AIDS発症阻害剤又はHIV-1感染阻害剤をスクリーニングする方法、

〔１８〕 HIV-1の局在性を分析する工程を、ヒトT細胞株指向性HIV-1に対するモノクローナル抗体を用いて行う、前記〔１７〕記載の方法、

〔１９〕 (a) 前記〔６〕～〔９〕いずれか記載のポリペプチドを発現する細胞又は前記〔１６〕記載の細胞；HIV-1エンベロープタンパク質を発現する細胞；及びスクリーニングの対象となる物質を混合してインキュベートを行う工程、及び

(b) HIV-1エンベロープタンパク質を発現する細胞と該細胞との融合性を測定する工程、

を含んでなることを特徴とする、AIDS発症阻害剤又はHIV-1感染阻害剤をスクリーニングする方法、

〔20〕 (a) 前記〔6〕～〔9〕いずれか記載のポリペプチドを発現する細胞又は前記〔16〕記載の細胞；マウス又はヒトPBSF/SDF-1；及びスクリーニングの対象となる物質を混合してインキュベートを行う工程、及び

(b) 該細胞内のカルシウムイオン濃度を測定する、及び／又は発現したポリペプチドと該マウス又はヒトPBSF/SDF-1との結合活性を測定することを特徴とする、AIDS発症阻害剤若しくはHIV-1感染阻害剤、又は該PBSF/SDF-1のアゴニスト若しくはアンタゴニストをスクリーニングする方法、

〔21〕 該アンタゴニストが造血幹細胞遊離促進剤である前記〔20〕記載の方法、

〔22〕 前記〔6〕～〔9〕いずれか記載のポリペプチドを発現する細胞又は前記〔16〕記載の細胞を含む、AIDS発症又はHIV-1感染を検出するためのキット、

〔23〕 (a) 前記〔6〕～〔9〕いずれか記載のポリペプチドを発現する細胞又は前記〔16〕記載の細胞、及びHIV-1に感染していることが疑われる患者の血清、血球又は血液を混合してインキュベートを行う工程、及び

(b) 該細胞におけるHIV-1の局在性を分析する、又はHIV-1感染細胞と該細胞との融合性を測定する工程、

を含んでなることを特徴とする、AIDS発症又はHIV-1感染を検出する方法、に関するものである。

#### 図面の簡単な説明

図1は、マウスPBSF/SDF-1のcDNA塩基配列、及び該塩基配列にコードされるマウスPBSF/SDF-1のアミノ酸配列を示す図である。

図2は、実施例2のノーザンブロッティング法による電気泳動の結果を示す図

である。Aはマウス組織のmRNAについての結果を示し、Bはマウス胎児のmRNAについての結果を示す。

図3は、実施例6の結果を示す図である。図中、横軸は経過時間を示し、縦軸は蛍光強度の比（〔340nmにおける蛍光強度〕／〔380nmにおける蛍光強度〕）を示す。使用した細胞はケモカインレセプターが発現していないCHO細胞である。

図4は、実施例6の結果を示す図である。図中、横軸は経過時間を示し、縦軸は蛍光強度の比（〔340nmにおける蛍光強度〕／〔380nmにおける蛍光強度〕）を示す。使用した細胞はヒトケモカインレセプターCCCKR2Bが発現したCHO細胞である。

図5は、実施例6の結果を示す図である。図中、横軸は経過時間を示し、縦軸は蛍光強度の比（〔340nmにおける蛍光強度〕／〔380nmにおける蛍光強度〕）を示す。使用した細胞はマウスケモカイン（PBSF／SDF-1）のレセプター（マウスCXCR4）が発現したCHO細胞である。

図6は、実施例6の結果を示す図である。図中、横軸は経過時間を示し、縦軸は蛍光強度の比（〔340nmにおける蛍光強度〕／〔380nmにおける蛍光強度〕）を示す。使用した細胞はヒトケモカインレセプターCXCR4／fusin／HUMSTRが発現したCHO細胞である。

図7は、実施例6の結果を示す図である。図中、横軸は経過時間を示し、縦軸は蛍光強度の比（〔340nmにおける蛍光強度〕／〔380nmにおける蛍光強度〕）を示す。使用した細胞はマウスCXCR4が発現したCHO細胞である。

図8は、マウスCXCR4がヒトT細胞株指向性HIV-1のenv蛋白質を介する膜融合を支持することを示す図である。ターゲット細胞であるNIH3T3にはヒトCD4、T7 polymerase、 $\beta$ -galの $\omega$ -subunitを発現する組み換えワクシニアウイルスを感染させた。感染後、それらの細胞にマウスCXCR4、ヒトCXCR4、ヒトCCR5をトランスフェクトした。エフェクター細胞であるHeLaS3にはNL432或いはSF162 由



来のenv 蛋白質と $\beta$ -galの $\alpha$ -subunitを発現する組み換えワクシニアウイルスを感染させた。それらの細胞を細胞融合させた後に $\beta$ -galアッセイに用いた。

図9は、マウス CXCR4がヒトT細胞株指向性 HIV-1ウイルスの感染を支持することを示す図である。SW480(A)細胞に、それぞれヒトCD4 とケモカイン受容体（マウスCXCR4、ヒトCXCR4、ヒトCCR5、ヒトCCR2b）をトランスフェクトし、HIV-1のNL432株、IIIB株、SF162株をそれぞれ感染させた後に細胞溶解物を $\beta$ -galアッセイに用いた。

図10は、マウス CXCR4がヒトT細胞株指向性 HIV-1ウイルスの感染を支持することを示す図である。HOS細胞(B)に、それぞれヒトCD4 とケモカイン受容体（マウスCXCR4、ヒトCXCR4、ヒトCCR5、ヒトCCR2b）をトランスフェクトし、HIV-1のNL432株、IIIB株、SF162株をそれぞれ感染させた後に細胞溶解物を $\beta$ -galアッセイに用いた。

図11は、マウス CXCR4がヒトT細胞株指向性 HIV-1ウイルスの感染を支持することを示す図である。U87MG細胞(C)に、それぞれヒトCD4 とケモカイン受容体（マウスCXCR4、ヒトCXCR4、ヒトCCR5、ヒトCCR2b）をトランスフェクトし、HIV-1のNL432株、IIIB株、SF162株をそれぞれ感染させた後に細胞溶解物を $\beta$ -galアッセイに用いた。

図12はキメラプロウィルスクロンの構造を示す模式図である。SF162のenv或いはV3ループを、ヒトT細胞株指向性 HIV-1であるNL432のプロウィルスDNAに組み込んだ(E:EcoRI、Ba:BamHI、St:StuI、Nh:NheI)。

図13は、エンベロープ蛋白gp120のV3ループが、マウス CXCR4を介するHIV-1エントリに必須であることを示す図である。ヒトCD4と図中に示す受容体を発現するSW480細胞に、HIV-1のNL432株、SF162株及びキメラプロウィルスクロンであるNL432env-162、NL432V3-162を感染させた。

発明を実施するための最良の形態

## 1. 本発明のDNAについて

本発明のDNAは、マウスの新規CXCケモカインレセプターであるマウスPBSF/SDF-1のレセプター（マウスCXCR4）をコードするDNAであれば特に限定されないが、具体的には、以下のDNAが例示される。

1) 配列表の配列番号：17に記載のアミノ酸配列の全部又は一部からなるポリペプチド、又は該ポリペプチドを含むポリペプチドであって、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

2) 配列表の配列番号：17に記載のアミノ酸配列の全部又は一部のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも一つが生じ、かつマウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

3) 配列表の配列番号：1に記載の塩基配列の全部又は一部からなるDNA、又は該DNAを含むDNAであって、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

4) 配列表の配列番号：1に記載の塩基配列の全部又は一部のDNA、又は該DNAを含むDNAであって、1以上の塩基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも一つが生じ、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

5) 前記1)～4)いずれか記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

また、2)において、「1以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換」とは、特に限定されるものではなく、例えば1個又は数個のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換をいう。ここで数個とは、例えば10個以下の個数をいう。さらに、4)において、本発明のDNAの塩基の欠失、付加、挿入又は置換の

程度は1以上であるが、好ましくは1～数個が好ましい。ここで数個とは、例えば10個以下の個数をいう。また、発現されるポリペプチドの機能又は活性が実質的に同じ程度であるならば、化学的または生化学的な改変、あるいは非天然または誘導体化されたアミノ酸残基や塩基を含んでいてもよい。

本発明のDNAの単離は、既知のケモカインレセプター間でホモロジーを有する塩基配列をPCRにより増幅し、該増幅断片をプローブとしてマウスのcDNAライブラリー等をスクリーニングすることにより行うことができる。

なお、本発明において用い得る実験手法は、一般的な分子生物学的実験手法（DNAの電気泳動、電気泳動により分離したDNAをゲル中から回収する方法、ライゲーション、宿主の形質転換、組換え宿主の培養、プラスミドDNAの調製、DNAの制限酵素による切断、DNAの放射標識など）は、例えばMolecular Cloning 第2版(ManiatisらCold Spring Harbor Laboratory, New York(1989))に記載されているような、当業者に公知の方法が採用される。

PCRに用いるプライマーとしては、報告されているヒトケモカインレセプターで保存されているアミノ酸配列に基づいて、例えば、第2膜貫通領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列に対する正方向の縮重プライマーの5'側に適切な制限酵素部位を付加したもの、および第7膜貫通領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列に対する逆方向の縮重プライマーの5'側に適切な制限酵素部位を付加したものが挙げられる。かかるプライマーはDNA合成機を用いて合成することができる。

また、cDNAのクローニングに用いられるマウスmRNAは、マウスB前駆細胞株DW34（京都大学の西川教授より供与）等の細胞から、市販のmRNA精製用キットを用いて精製し得る。

また、マウスCXCR4のcDNA由来のDNA断片等を用いて、マウスゲノムDNAのクローニングを行うこともできる。

得られるcDNAの塩基配列やゲノムDNAの塩基配列を、例えば、GenBank/

EMBL/DDBJ DNA 配列データベースに対して核酸ホモロジー検索を行うことにより、得られる cDNA がケモカインレセプターをコードしているかどうかを推定することができる。配列表の配列番号：1 に、得られる cDNA の塩基配列を示す。また、配列表の配列番号：1 の第 120 位～第 1196 位の塩基配列が最長のオープンリーディングフレームであることから、このオープンリーディングフレームの塩基配列に基づいて推定したアミノ酸配列（配列表の配列番号：17）について、Genbank、EMBL、DDBJ などのデータベースに対して DNASIS（日立）、BLAST (Altschul, F. ら, J. Mol. Biol., 215, 403-410) などのプログラムを用いて、ホモロジー検索を行い、本発明の DNA にコードされるポリペプチドについてさらに検討を加えることができる。

その結果、配列表の配列番号：17 に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、ケモカインレセプターに特徴的な 7 つの膜貫通ドメインを含む三量体 G タンパク質結合型レセプターであると推定された。また、既知の CXC ケモカインレセプターのアミノ酸配列と比較した結果、ヒト CXCR4/fusin/HUMSTSR が最も類似している事が明らかとなった（相同率 90%）。

また、本発明の DNA を発現させた細胞は、ケモカイン（マウス PBSF/SDF-1）に対するレセプター活性、細胞内カルシウム濃度上昇活性のいずれをも有していたことから、本発明の DNA は新規のマウスケモカインレセプターをコードしていることが分かり、該 DNA にコードされるタンパク質をマウス CXCR4 と命名する。

「ケモカイン」とは、前記のように白血球が炎症反応局所への走化性を示すための誘因物質のうち、遊走する白血球に対してある程度の選択性を有し、特徴的な 4 つのシステイン残基を有するポリペプチドのファミリーをいう。これらはアミノ酸配列および生物活性に関連性がある。ケモカインの 4 つのシステイン残基は、第 1 と第 3 の残基間および第 2 と第 4 の残基間でそれぞれジスルフィド結合している。第 1 と第 2 のシステイン残基間に別のアミノ酸を 1 つ含むケモカイン

を「CXCケモカイン」、別のアミノ酸を含まないケモカインを「CCケモカイン」、として区別している。一般に、CCケモカインは単球を遊走させて好中球を遊走させず、CXCケモカインは好中球を遊走させて単球を遊走させないことが知られている。

「ケモカインレセプター」とは上記ケモカインに特異的に結合する細胞膜タンパク質ファミリーをいう。ケモカインレセプターはアミノ酸配列や構造上の関連がある。ケモカインレセプターはすべてロドプシンファミリーに特徴的な7つの膜貫通ドメインと三量体Gタンパク質との結合ドメインを有している。ケモカインレセプターはリガンドに対する特異性から2つのサブグループに分類される。上記ケモカインのうちCXCケモカインに特異的に結合するものを「CXCケモカインレセプター」としてCCケモカインに特異的に結合する「CCケモカインレセプター」と区別している。一般にケモカインレセプターはそれぞれのリガンドと結合した時に、細胞内カルシウム濃度を上昇させる作用を有している。また最近、ケモカインレセプターにはケモカインのレセプターとしての活性を持つだけでなく、細胞膜上に存在するCD4 と呼ばれる分子と協調してHIV-1 のレセプターとしての活性を有するものがあることが明らかとなっている。

本明細書において、マウスPBSF/SDF-1に対するレセプター活性は、例えば次のようにして測定することができる。

マウスCXCR4 のリガンドであるPBSF/SDF-1ペプチドを、例えば、ボルトンハンター試薬などを用いて<sup>125</sup>Iで標識したり、アルカリホスファターゼなどの酵素で標識する。標識されたPBSF/SDF-1ペプチドを、レセプター活性を有するポリペプチドを発現する細胞の懸濁液に添加し、一定の温度でインキュベートする。洗浄後、細胞に結合したPBSF/SDF-1ペプチドの量を、標識量を測定することによりレセプター活性を測定し得る。ここで用いられる細胞としては、例えば、マウスB前駆細胞株DW34、ヒト胎児腎細胞株293細胞、またはマウスCXCR4 を発現するように操作を行ったチャイニーズハムスター卵巣由来細胞株CHO細胞等

が挙げられる。

また、本発明のポリペプチドはリガンドと結合したときに細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するものが好ましい。かかる活性は、例えば次のようにして測定することができる。

上記の活性の測定対象であるポリペプチドを発現する細胞を緩衝液で洗浄した後、適当な緩衝液（例えば、HBSS（20mM Hepes、pH 7.4中に、125mM NaCl、5mM KCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.5mM グルコース及び0.1% BSAを含む）等）に懸濁し、さらに細胞内カルシウムイオンにより影響を受けるような蛍光試薬を加え、インキュベートすることで細胞を標識し得る。標識した細胞を緩衝液で洗浄した後、適当な緩衝液に懸濁し、リガンドとなるケモカインを加えたときの蛍光強度の変化から、活性を測定することができる。

例えば、蛍光試薬としてfura-PE3AM（テキサス フルオレッセンス ラボラトリー）を用いる場合、励起波長が340nmと380nm、蛍光波長が510nm、レスポンスが0.5秒の条件で測定する。そして、〔励起波長380nmでの蛍光強度〕に対する〔励起波長340nmでの蛍光強度〕の比を求める。ケモカインの添加により測定対象の細胞において細胞内カルシウムイオン濃度が上昇した場合、該蛍光強度の比の上昇が認められる。また、種類の異なるケモカインを添加することにより、リガンドに対するレセプターの特異性を確認することもできる。

また、マウスCXCR4 のmRNAの存在の確認は、通常の特異的なmRNAの検出法を用いて行い得る。例えば、mRNAはアンチセンスRNA またはcDNAをプローブとして用いた、ノーザンブロット分析またはインサイチュハイブリダイゼーション法により検出し得る。又は、mRNAはまたmRNAを逆転写酵素でcDNAに変換した後、適当なプライマーの組み合わせによるPCR 法によっても検出し得る。

## 2. 本発明のポリペプチドについて

本発明のポリペプチドとしては、例えば以下のものが挙げられる。

1) 本発明のDNAによりコードされるポリペプチドであって、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチド。

2) 配列表の配列番号：17に記載のアミノ酸配列の全部又は一部からなるポリペプチド、又は該ポリペプチドを含むポリペプチドであって、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチド。

3) 配列表の配列番号：17に記載のアミノ酸配列の全部又は一部のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも一つが生じ、かつマウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチド。

4) マウスB前駆細胞株DW34に由来する、前記1)～3)いずれかのポリペプチド。

3)の態様において、本発明のポリペプチドのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の程度は1以上であり、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有する限り、変異の個数は特に限定されない。例えば、1～数個が例示される。ここで数個とは、例えば10個以下の個数をいう。また、ポリペプチドの機能又は活性が実質的に同じ程度であるならば、化学的または生化学的な改変、あるいは非天然または誘導体化されたアミノ酸残基を含んでいてもよい。

また、本発明のポリペプチドは、マウスB前駆細胞株DW34に由来するものが好ましい。

また、本発明のポリペプチドの存在の確認は、通常の特異的なタンパク質の検出法を用いて行い得る。例えば、マウスCXCR4に特異的な抗体を用いる通常の免疫沈降法またはウエスタンブロット法、FACSによる解析により確認し得る。

## 3. 本発明の発現ベクター及び形質転換体について

本発明の発現ベクターは、例えば、pEFBOS、pCAGGS tkNeo、pMXなどの公知のベクターに、本発明のDNAを組み込むことにより得ることができる。

また、本発明の形質転換体は、本発明の発現ベクターを所望の宿主に導入することにより得ることができる。宿主としては特に限定されないが、哺乳類細胞株が好ましい。哺乳類細胞株としては、例えば、マウスB前駆細胞株、ヒト胎児腎細胞株、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株等が挙げられ、ハムスター卵巣由来細胞株が好ましい。発現ベクターを宿主に導入する方法としては、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法等の公知の方法を用いれば良い。

また、上記の形質転換体を、上記の発現ベクターの発現可能な条件下で培養することにより、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドを生産することができる。このようにして生産されるポリペプチドは、通常のカラムクロマトグラフィー又は本発明の抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィー等の方法により、容易に精製することができる。

#### 4. 本発明の単クローン抗体について

本発明の単クローン抗体としては、本発明のマウスCXCR4 ポリペプチドに対するもの、及び該ポリペプチドとヒトCXCR4/fusin/HUMSTR との融合タンパク質に対するものが挙げられる。

かかる単クローン抗体は、例えば次のようにして作製することができる。

免疫原として、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列の一部に基づいて通常のペプチド合成機で合成した合成ペプチドを、又はマウスCXCR4 を発現するベクターで形質転換した細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞などにより産生されたマウスCXCR4 を細胞のまま、或いは通常のタンパク質化学的方法で精製して得られるタンパク質を用いる。かかる免疫原を用いて、マウス、ラット、ハムスター、ウサ



ギなどの動物を免疫し、脾臓またはリンパ節から細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合させて、Koehler およびMilsteinの方法(Nature, 256, 495-497(1975)) またはその改良法であるUedaらの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 79, 4386-4390(1982))に従ってハイブリドーマを作製する。かかるハイブリドーマは単クローン抗体を産生させ得る。

より具体的には、例えば、以下の工程によりマウスCXCR4 の単クローン抗体を得ることができる。

- (a) マウスCXCR4 タンパク質によりマウスを免疫する工程、
- (b) 免疫マウスの脾臓を摘出して脾臓細胞を分離する工程、
- (c) 分離された脾臓細胞とマウスミエローマ細胞とを、融合促進剤（例えば、ポリエチレングリコール）の存在下で、上記のKoehler らに記載の方法によって融合する工程、
- (d) 非融合ミエローマ細胞が成長しない選択培地で得られたハイブリドーマ細胞を培養する工程、
- (e) ELISA 法および免疫電気移転法などにより所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を選択し、限界希釈法などによりクローニングする工程、および
- (f) 抗マウスマウスCXCR4 の単クローン抗体を回収する工程。

また、マウスCXCR4 とヒトCXCR4/fusin/HUMSTR との融合タンパク質に対する単クローン抗体も本発明に含まれる。

このような単クローン抗体は、マウスCXCR4 とヒトCXCR4/fusin/HUMSTR との融合タンパク質を得、このタンパク質やそのペプチドを免疫原として、上記の方法等により得ることができる。

## 5. 本発明の医薬組成物及び細胞について

本発明の医薬組成物は、マウスPBSF/SDF-1を含有し、AIDS発症阻害剤またはHIV-1感染阻害剤として用いられるものである。

本発明の医薬組成物は、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち、通常用いられる投与形態、例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等として経口投与することができ、あるいは液剤、乳剤、懸濁液剤、リポソーム剤などとして筋肉内注射又は皮下注射することができ、また、坐剤として直腸投与することもできる。このような剤形は、医薬として許容される通常の担体、賦型剤、結合剤、安定剤、緩衝剤、溶解補助剤、等張剤等と本発明の有効成分を配合することにより製造することができる。

投与量、投与回数は、患者の症状、症歴、年齢、体重、投与形態等によって異なるが、例えば成人に経口投与する場合、通常、1日当たり5～500mg、好ましくは10～100mgの範囲で適宜調節して、1回又は数回に分けて投与することができる。

また、本発明の細胞は、上記の本発明のポリペプチドを発現する細胞、又は該ポリペプチド及びヒトCD4タンパク質の両者を発現する細胞である。

かかる細胞は、例えば次のようにして得ることができる。即ち、マウスCXCR4をコードするポリヌクレオチドを組み込んだベクターを得る。ベクターとしては、pEFBOS、pCAGGS、pMX等の公知のものが使用できる。次いで、発現用の細胞に上記のポリヌクレオチドを組み込んだベクターを導入することにより、本発明の細胞を得ることができる。発現用の細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株、CHO細胞、ヒト結腸癌細胞株、SW480細胞、ヒト骨芽肉腫細胞株、HOS細胞、ヒトグリア芽細胞株、U87MG細胞等が挙げられる。また、ベクターの導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法やLipofectin (GibcoBRL社)、Lipofectamine (GibcoBRL社)を用いる方法が挙げられる。

マウスCXCR4はHIV-1のco-receptor となることを見出されたことから、本発明の細胞は、AIDS発症阻害剤やHIV-1感染阻害剤、PBSE/SDF-1のアゴニストやアンタゴニストのスクリーニングやAIDS発症またはH

I V - 1 感染の検出等に用いることができる。

#### 6. 本発明のスクリーニング方法について

本発明のスクリーニング方法には、A I D S 発症阻害剤、H I V - 1 感染阻害剤、及びマウス又はヒト P B S F / S D F - 1 のアゴニストやアンタゴニストをスクリーニングする方法がある。具体的には次の通りである。

1) (a) 上記に記載の本発明の細胞；ヒト T 細胞株指向性 H I V - 1 ；及びスクリーニングの対象となる物質を混合してインキュベートを行う工程、及び

(b) 該細胞における H I V - 1 の局在性を分析する工程、  
を含んでなることを特徴とする、A I D S 発症阻害剤又は H I V - 1 感染阻害剤をスクリーニングする方法。

2) (a) 上記に記載の本発明の細胞；H I V - 1 エンベロープタンパク質を発現する細胞；及びスクリーニングの対象となる物質を混合してインキュベートを行う工程、及び

(b) H I V - 1 エンベロープタンパク質を発現する細胞と該細胞との融合性を測定する工程、  
を含んでなることを特徴とする、A I D S 発症阻害剤又は H I V - 1 感染阻害剤をスクリーニングする方法。

3) (a) 上記に記載の本発明の細胞；マウス又はヒト P B S F / S D F - 1 ；及びスクリーニングの対象となる物質を混合してインキュベートを行う工程、及び

(b) 該細胞内のカルシウムイオン濃度を測定する、及び／又は発現したポリペプチドと該マウス又はヒト P B S F / S D F - 1 との結合活性を測定することを特徴とする、A I D S 発症阻害剤若しくは H I V - 1 感染阻害剤、又は該 P B S F / S D F - 1 のアゴニスト若しくはアンタゴニストをスクリーニングする方法。

また、ヒト T 細胞株指向性 H I V - 1 としては、例えば H I V - 1 I I I B 株（熊本大学の原田教授より供与）や H I V - 1 N L 4 3 2 株（徳島大学の足立教授よ

り供与)が挙げられる。

1) について

HIV-1の局在性を分析する工程としては、ヒトT細胞株指向性HIV-1に対するモノクローナル抗体を用いて行うことがより好ましい。

かかるモノクローナル抗体を用いての分析方法としては特に限定されるものではなく、通常用いられる公知の方法が挙げられる。

また、HIV-1の局在性を分析する方法としては、以下に述べる酵素法も用いることができる。

即ち、この方法で用いられる「本発明の細胞」としては、ヒトCD4タンパク質とco-receptorを発現する細胞(例えば、SW480、U87MG、HOS等)であって、HIV-1の遺伝子発現プロモーターであるLTRの下流に酵素(例えば $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、CAT等)の遺伝子が導入されたものが好ましく用いられる。HIV-1がかかる細胞に感染すると、ウイルスのタンパク質の一種であるtatタンパク質が発現し、それがLTRを活性化させる。したがって、細胞溶解物中に含まれる酵素活性を測定することにより、感染量を定量できる。

2) について

HIV-1エンベロープタンパク質を発現する細胞としては、例えばHeLaS3にHIV-1エンベロープタンパク質の遺伝子を導入したものが挙げられ、さらに例えば $\beta$ -ガラクトシダーゼのサブユニット( $\alpha$ 又は $\omega$ のいずれか一方)の遺伝子を導入したものが好適に用いられる。また、「本発明の細胞」としては、例えばNIH3T3に、ヒトCD4タンパク質とco-receptorを導入したものであって、さらに例えば $\beta$ -ガラクトシダーゼのサブユニット( $\alpha$ 又は $\omega$ のいずれか一方であって、HIV-1エンベロープタンパク質を発現する細胞に導入されたものとは異なるもの)の遺伝子を導入したものが好適に用いられる。HIV-1エンベロープタンパク質を発現する細胞と本発明の細胞とが細胞融合した場合、 $\beta$ -ガラ

クトシダーゼの $\alpha$ -サブユニットと $\omega$ -サブユニットが会合し、活性型の $\beta$ -ガラクトシダーゼとなる。したがって、両細胞を混合して培養した後に、細胞溶解物中に含まれるガラクトシダーゼ活性を測定することにより、細胞融合量が測定できる。

### 3) について

(a) 工程においてインキュベートが行われた結果、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性が認められた場合、対象物質はアゴニストの可能性がある。また、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性は認められないものの、対象物質とレセプターとの結合が認められた場合、対象物質はアンタゴニストの可能性がある。また、マウスPBSF/SDF-1の細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び／又はレセプターとの結合活性に影響を及ぼす場合、すなわち活性を阻害する場合、対象物質はアンタゴニストの可能性がある。また、該アンタゴニストとしては、造血幹細胞遊離促進剤が例示される。

## 7. 検出キット及び検出方法について

本発明のAIDS発症又はHIV-1感染を検出するためのキットは、本発明の細胞を含むことを特徴とする。

かかるキットを用いることにより、簡単にAIDS発症又はHIV-1感染を検出することができる。本発明のキットは、以下に示す本発明の検出方法を利用して検出を行うためのものである。

また、本発明のAIDS発症又はHIV-1感染を検出する方法は、

(a) 上記に記載の本発明の細胞、及びHIV-1に感染していることが疑われる患者の血清、血球又は血液を混合してインキュベートを行う工程、及び

(b) 該細胞におけるHIV-1の局在性を分析する、又はHIV-1感染細胞と該細胞との融合性を測定する工程、を含んでなることを特徴とするものである。  
法。

ここで、HIV-1の局在性を分析する方法としては、本発明のAIDS発症阻害剤又はHIV-1感染阻害剤において用いられる方法が挙げられる。また、HIV-1感染細胞と該細胞との融合性を測定する方法としては、本発明のAIDS発症阻害剤又はHIV-1感染阻害剤において用いられる方法が挙げられる。なお、(b)におけるHIV-1感染細胞とは、HIV-1に感染していることが疑われる患者の血球であって、HIV-1に感染しているものである。

#### 8. 本発明の有用性について

本発明のマウスCXCR4 とヒトCXCR4/fusin/HUMSTR は共に、マウスPBSF/SDF-1 に反応する。マウスとヒトのPBSF/SDF-1は71アミノ酸のうち1つのアミノ酸の差異しか認められないので、マウスCXCR4 はヒトPBSF/SDF-1にも結合すると期待される。ヒトPBSF/SDF-1はCXCR4/fusin/HUMSTR を介するT細胞株指向性HIV-1の感染を阻害するので、本発明のマウスCXCR4 タンパク質に対する抗体、およびマウスCXCR4 とヒトCXCR4/fusin/HUMSTR との細胞外ドメインを互いに置換して得られるT細胞株指向性HIV-1との結合部位を有するキメラタンパク質に対する抗体は、HIV-1の感染阻害剤、すなわちAIDSの治療薬として用いられ得る。

また本発明により提供されるマウスCXCR4 タンパク質およびマウスCXCR4 とヒトCXCR4/fusin/HUMSTR との細胞外ドメインを互いに置換したキメラタンパク質のアゴニスト、アンタゴニストをスクリーニングする方法により、アゴニスト、アンタゴニストを得、HIV-1の感染阻害剤、すなわちAIDSの治療薬として用いられ得る。

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

## 実施例 1 (マウスCXCR4 のcDNAのクローニング)

### (1) プライマーの合成

既知のケモカインレセプターのアミノ酸配列に基づいて、第2膜貫通領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列に対する正方向の縮重プライマーC2F2-2(配列表の配列番号: 5)、第7膜貫通領域のアミノ酸配列をコードするDNA配列に対する逆方向の縮重プライマーC4R1(配列表の配列番号: 6)を、DNA合成機(Cyclone Plus, 日本ミリポア)を用いて合成した。

### (2) マウスB前駆細胞株DW34からのmRNAの精製

マウスB前駆細胞株DW34をRPMI 1640培地に懸濁し、一週間培養した後、ダルベッコPBS(-)(ニッスイ)で洗浄し、mRNA精製キット(ファルマシア)を用いてmRNAを精製した。

### (3) マウスCXCR4 のcDNA断片のクローニング

マウスB前駆細胞株DW34から精製したmRNAの200ngについて、Ready-To-Go T-Primed First-Strand キット(ファルマシア)を用いて一本鎖cDNAを合成した。この一本鎖cDNAを鋳型とし、プライマーとしてC2F2-2およびC4R1を、耐熱性DNAポリメラーゼとしてTaqを用いて、PCR反応(94℃で0.5分間、55℃で0.5分間、72℃で1分間の条件で30サイクル)を行った。得られた反応液を、低融点アガロースゲル電気泳動で分離し、目的のサイズ(約690bp)のDNAバンドを切り出し、Wizard PCR Preps DNA精製システム(プロメガ)を用いてDNA断片を精製した。得られたDNA断片をpT7Blueベクターに、DNAライゲーションキット(タカラ)を用いて挿入した。この挿入DNAの塩基配列を、PRISM Ready Reactionシーケンスキット(Applied Biosystems社)およびDNAシーケンサー(Applied Biosystems社)を用いて決定した。得られたマウスCXCR4のcDNA配列を、

配列表の配列番号：2に示す。上記のようにして得られたマウスCXCR4のcDNA配列を基に配列表の配列番号：7および配列表の配列番号：8に示すプライマーを合成し、Marathon cDNA Amplification キット(Clontech 社)を用い、上記のようにして得たDW34細胞のcDNAを鋳型にして5'末端を含むcDNAクローンを得た。得られたマウスCXCR4のcDNA配列を、配列表の配列番号：3に示す。

## 実施例2 (マウスCXCR4の各組織における発現)

### (1) プローブの作製

マウスCXCR4のマウス各組織における発現を検討するために、まず、以下のよう  
にプローブを作製した。マウスCXCR4の遺伝子の塩基配列に基づいて、第2膜  
貫通領域部分に対応する正方向のDNA配列(配列表の配列番号：15)および第  
7膜貫通領域部分に対応する逆方向のDNA配列(配列表の配列番号：16)をプ  
ライマーとして合成し、次のPCRに用いた。上記実施例1の(3)項で得られた  
塩基配列のcDNAを鋳型とし、Taqポリメラーゼを用いて、94℃で1分間、55  
℃で1分間、72℃で2分間の条件で30サイクルのPCR反応を行った。PCR反  
応物をアガロースゲル電気泳動で分離し、目的のサイズ(690bp)のDNAバンドを  
切り出し、Wizard PCR Preps DNA精製システムを用いてDNA断片を精製した。得  
られたDNA断片50ngを、Prime-It II ランダムプライマーラベリングキット(ス  
トラタジーン)を用いて<sup>32</sup>P標識し、プローブとして用いた。

### (2) マウス組織およびマウス胎児のノーザンブロット分析

種々のマウス組織のmRNA、及び生後7日目、11日目、15日目、17日目の  
マウス胎児のmRNAを電気泳動で分離してトランスファーしたメンブラン、並びに  
上記(1)項で得たプローブを用いて、ハイブリダイゼーションを行った。メン  
ブランの洗浄は、0.05% SDSを含む2xSSCに浸して、室温で15分間を2回行っ



た後、さらに0.1 % SDS を含む0.1xSSC に浸して50 °Cで20分間を2回行った。このメンブランの放射線をオートラジオグラフィーで検出した。この結果を図2のA（マウス組織）及びB（マウス胎児）に示す。バンドの濃さから明らかなように、胸腺、リンパ節、脾臓に強いシグナルが得られ、脳、小腸、胃、腎臓で弱いシグナルが得られた。またマウス胎児の全てで強いシグナルが得られた。

### 実施例3（マウスCXCR4 のゲノムDNA のクローニング）

#### （A）プローブの作製

上記実施例1の（3）項で得られたマウスCXCR4 のcDNAの塩基配列に基づいて、適切な正方向および逆方向のプライマーを合成し、次のPCR に用いた。上記実施例1（3）項で得られたcDNAから二本鎖DNAを得、この二本鎖DNAを鋳型とし、Taq ポリメラーゼを用いてPCR 反応を行い、アガロース電気泳動で分離し、目的のサイズ（約690bp）のDNA バンドを切り出し、DNA 断片を精製した。得られたDNA 断片50ngを、Prime-It II ランダムプライマーラベリングキット（ストラタジーン）を用いて<sup>32</sup>P 標識し、プローブとして用いた。

#### （B）マウスゲノムライブラリーのクローニング

まず、ファージベクターλFIXII に組み込んだ129/SvJ マウス肝臓ゲノムライブラリーを大腸菌に感染させ、一次スクリーニングとして、プレートに播いてプラークを形成させた後、ナイロンメンブラン（デュポン社）にトランスファーした。このメンブランをプレハイブリダイゼーション液（5×SSPE（0.9M NaCl、0.05 M リン酸ナトリウムpH7.7、0.005M Na<sub>2</sub> EDTA）、50%ホルムアミド、5×デンハルト液、50 μg/mlサケ精子DNA、0.1 % SDS）に浸してプレハイブリダイゼーションした後、上記（A）項で得られたプローブとハイブリダイゼーション液（5×SSPE、50%ホルムアミド、1×デンハルト液、10%デキストラン硫酸二ナトリウム

、50  $\mu$ g/mlサケ精子DNA、0.1 %SDS)に浸して42°C15時間ハイブリダイズさせた。メンブレンを洗浄した後、放射活性を検出し、シグナルを生じる陽性のプラークを選択し、逐次希釈して二次および三次のスクリーニングを行ない、2 個のシングルクローンを選択した。

クローニングしたファージDNA について種々の制限酵素で切断してアガロース電気泳動で分離し、バンドのパターンが同じものは同一クローンとし、同様のハイブリダイゼーションを繰り返して、できるだけ小さいサイズの陽性バンドを与えるように、制限酵素で切断した。選択した陽性DNA 断片を、pBluescripts KSI I ベクターに挿入し、ジデオキシ法により塩基配列を決定した。得られたマウス CXCR4 遺伝子のDNA 配列を、配列表の配列番号：4 に示す。また、配列表の配列番号：3 に示される塩基配列と、配列表の配列番号：4 に示される塩基配列から、最長のオープンリーディングフレームを含む塩基配列を見出し、この塩基配列を配列表の配列番号：1 に示す。そして、この配列表の配列番号：1 に示される塩基配列を、GenBank/EMBL/DDBJ DNA 配列データベースに対して核酸ホモロジー検索を行った。この検索の結果、得られたクローンは、新規のマウスケモカインレセプターをコードするDNA であることが明らかになり、これをマウスCXCR4 と命名した。

#### 実施例 4 (マウスCXCR4 のアミノ酸配列のホモロジー解析)

マウスCXCR4 の塩基配列に基づいて推定したアミノ酸配列（配列表の配列番号：17）は、ケモカインレセプターに特徴的な7つの膜貫通ドメインを含む三量体Gタンパク質結合型レセプターであると推定された。そのアミノ酸配列を、既知のCXCR4 ケモカインレセプターの配列と比較した（データベースとしてGenBank、EMBL、DDBJを用い、BLAST にて解析した）。その結果、ヒトCXCR4/fusin/HUMSTSR が最も類似しており（相同率90%）、サルCXCR4、ウシCXCR4 とはそれぞれ89%、86%の相同率であり、ラットIL-8RB、ウサギIL-8RA、ウサギIL-8RBとは

それぞれ49%、47%、45%の相同率であった。

#### 実施例 5 (マウスCXCR4 ならびにヒトCXCR4/fusin/HUMSTSR の発現)

##### (1) マウスCXCR4、ヒトCCCKR2B およびヒトCXCR4/fusin/HUMSTSR 発現ベクターの作製

既報のヒトケモカインレセプターであるCC CKR2Bの遺伝子ならびにCXCR4/fusin/HUMSTSR の遺伝子をクローニングするために、ヒト単球細胞株THP-1 のcDNAを用いて以下のようにPCR 反応を行った。THP-1 細胞のcDNA 500ngを鋳型として用い、配列表の配列番号：11および配列番号：12に示すプライマーをヒトCXCR4/fusin/HUMSTSR の増幅のために、そして、配列表の配列番号：9および配列表の配列番号：10に示すプライマーをCC CKR2Bの増幅のために、それぞれ500ngを用いた。反応を行うための酵素としてはTaq ポリメラーゼ（宝酒造社）を用いた。反応を、94℃、3分で1サイクル行った後、94℃で1分間、55℃で2分間、72℃で3分間の条件で35サイクル行い、さらに72℃で3分間の反応を行った。この反応で得られたヒトCXCR4/fusin/HUMSTSR およびCC CKR2Bの遺伝子断片を、それぞれpCRII(Invitrogen社)のTAクローニング部位へ組み込んだ。このようにして得られたプラスミドを、それぞれpCRIICXCR4およびpCRIICC CKR2Bと命名した。次に、得られたpCRIICXCR4およびpCRIICC CKR2B プラスミドを、それぞれNotIおよびXboI（ともに宝酒造社）で消化した後、pCAGGStkNeo のNotI/XboI 部位に組み込んだ。このようにして得られたプラスミドを、それぞれpCAN CXCR4 およびpCANCC CKR2Bと命名した。

マウスCXCR4 の遺伝子をクローニングするために、上記実施例1の(3)項で得られた配列表の配列番号：3で示されるマウスB前駆細胞株DW34の一本鎖cDNAを鋳型にPCR 法を行った。cDNA 100ngを鋳型として用い、配列表の配列番号：13および配列表の配列番号：14に示すプライマーを用いた。反応を行うための

酵素としてはExTaq（宝酒造社）を用いた。反応を、94℃で3分間、1サイクル行った後、94℃で1分間、55℃で1分間、72℃で2分間の条件で20サイクル行い、さらに72℃で5分間の反応を行った。得られたマウスCXCR4 遺伝子断片をNotIとXhoI（宝酒造社）で消化した後、pCAGGStkNeo のNotI/XhoI 部位に組み込んだ。このようにして得られたプラスミドを、pCANmPBSFRと命名した。

## （２）CHO 細胞でのマウスCXCR4、ヒトCXCR4/fusin/HUMSTSR、ヒトCC CKR2Bの発現

CHO 細胞を直径10cmの細胞培養のシャーレー（岩城硝子社）で、37℃、10%炭酸ガス存在下で1日培養した。上記（１）項で得た3種のケモカインレセプターの発現ベクター（pCANmPBSFR、pCANCXCR4 およびpCANCC CKR2B）のDNA それぞれ30μg を蒸留水25μl に溶解した後、250mM 塩化カルシウム（ナカライテスク社）500 μl を添加した。DNA および塩化カルシウムの混合液に2×BBS 溶液（50mM BES(SIGMA), 280mM塩化ナトリウム（ナカライテスク社）、および1.5mM リン酸水素二ナトリウム（ナカライテスク社））500 μl を添加した後、室温で25分間静置した。このように調製したDNA 溶液をCHO 細胞を培養しているシャーレーに滴下し、35℃、3%炭酸ガス存在下で20時間培養し、細胞にDNA を導入した。DNA 導入した細胞を、3ml のPBS(+)で2回洗浄した後、10mlの10%溶液FCS を含むα-MEM(GIBCO社)を添加し、37℃、5%炭酸ガス存在下で1日培養した。

次いで、10%FCS を含むα-MEM(GIBCO社)培地に2mg/ml GENETICIN(和光純薬工業社)を添加した培地に懸濁し、5×10<sup>3</sup> 個/シャーレーで直径10cmの細胞培養のシャーレー（岩城硝子社）に分注した。37℃、10%炭酸ガス存在下で培養を続け、GENETICIN 耐性の細胞をマウスCXCR4、ヒトCXCR4/fusin/HUMSTSR およびCC CKR2B発現CHO 細胞株として細胞内カルシウム濃度測定用に用いた。以下の実施例6に示すように、CC CKR2Bについては、特異的リガンドであるMCP-1の

添加による細胞内カルシウム濃度上昇活性があったため、レセプターの発現が確認された。また、マウスCXCR4 とヒトCXCR4/fusin/HUMSTSR の発現については、CC CKR2Bと同じ細胞株を用いて同様の形質転換および培養を行ったことから、同様に発現していると考えられる。

#### 実施例 6 (マウスCXCR4 の生物活性)

上記実施例 5 の (2) 項で得たマウスCXCR4 ならびにヒトケモカインレセプター (CXCR4/fusin/HUMSTSR および CC CKR2B) が発現しているCHO 細胞を、ダルベッコPBS(-)で洗浄した後、HBSS緩衝液(20mM Hepes, pH 7.4 中に、125mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM グルコース、および0.1 % BSAを含む)に $5 \times 10^6$  個/ml で懸濁し、さらにfura-PE3AM( テキサス フルオレッセンス ラボラトリー)を2.5  $\mu$ Mになるように加え、37°Cで30分間インキュベートした。HBSS緩衝液で洗浄した後、各CCケモカインレセプター発現細胞を同緩衝液に $5 \times 10^6$  個/ml で懸濁した。得られたケモカインレセプター発現細胞懸濁液各500  $\mu$ l に、ケモカイン (マウスPBSF/SDF-1またはヒトMCP-1)をそれぞれ100nM になるように加えたときの蛍光度の変化を、蛍光分光光度計(LS50B, PERKIN ELMER)を用いて、励起波長340nm と380nm, 蛍光波長510nm, レスポンス0.5 秒で測定した。その結果を、時間経過と340nm と380nm との蛍光強度の比で図3～図6に示す。

マウスPBSF/SDF-1刺激では、マウスCXCR4 及びヒトCXCR4/fusin/HUMSTSR 発現細胞で蛍光強度の比の上昇が認められ、CCケモカインレセプターであるCC CKR2B発現細胞では蛍光強度の比の上昇は認められなかった。なお、レセプターに対する陽性コントロールであるMCP-1 ペプチドによる刺激では、CC CKR2B発現細胞で蛍光強度の比の上昇が認められた。したがって、マウスPBSF/SDF-1は、本発明のマウスCXCR4 およびヒトCXCR4/fusin/HUMSTSR 発現CHO 細胞に対して、特異的に細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有することがわかった。また図7に示すようにマウスCXCR4 発現細胞では、マウスPBSF/SDF-1の連続しての添

加により蛍光強度の比が変化しない脱感作が認められた。脱感作は陰性コントロールであるヒトMCP-1 の添加では認められなかった。この結果より、本発明のレセプターは、マウスPBSF/SDF-1のレセプターである事が明らかとなった。

## 実施例 7

### 材料と方法

細胞株：マウス NIH3T3 細胞、ヒト小腸上皮由来のSW480 細胞、ヒトグリア細胞由来のU87MG は、10% FCSを含むDMEMで培養した。ヒト HeLaS3 細胞は10% FCSを含む RPMI1640 で培養した。ヒト骨芽細胞由来の HOS細胞は1%不必須アミノ酸（Gibco社）と10% FCS を含む Eagle MEMで培養した。

ウイルス：HIV-1 のNL432 株は、足立教授（徳島大学）より供与された。IIIB 株は、原田教授（熊本大学）より供与された。SF162 株は、J.A. Levy教授（カリフォルニア、サンフランシスコ大学）より供与された。HIV-1のキメラウイルスクローン、NL432env-162 と NL432V3-162は、井阪（塩野義製薬）より供与された。遺伝子組み換えワクシニアウイルス、Vac. Env（NL432 env）、Vac. Env 162（SF162 env）、Vac T4（CD4）は、塩田教授（東京大学）より供与された。LO-T7（T7 polymerase）は、M. Kohara（都立臨床研）より供与された。

細胞へのトランスフェクション：NIH3T3 細胞を1ウェルあたり $5 \times 10^4$  細胞の細胞密度で24ウェルプレートで一晩培養し、Lipofectamine（Gibco 社）を用いて pBluescriptに組み込んだケモカイン受容体遺伝子をトランスフェクトした。トランスフェクト開始後4 時間目に細胞を PBSで洗浄し、培養液を添加した後37℃で一晩培養して融合アッセイに使用した。SW480 細胞とHOS 細胞は、 $5 \times 10^5$  細胞の細胞密度で 6センチメートルプレートで一晩培養した。SW480 細胞には pEF

-BOSに組み込んだ受容体遺伝子を  $5\mu\text{g}$ 、CD4 を発現するベクターである T4-Neo を  $7.5\mu\text{g}$ 、LTR (EcoRV)- $\beta$ -Gal-Neoを $2.5\mu\text{g}$ のプラスミド混合物を改良型リン酸カルシウム法によりトランスフェクトした。ヒトCD4 と LTR-Galを恒常的に発現するHOS 細胞には、同じ方法でpEF-BOS に組み込んだ受容体遺伝子を $15\mu\text{g}$ トランスフェクトした。細胞は3%  $\text{CO}_2$ 存在下で $35^\circ\text{C}$ 一晩培養し、PBS (-) で洗浄後に $0.5\text{ mM}$  EDTA を含むPBS を用いて回収した後、12ウェルプレートにまいて $37^\circ\text{C}$ で一晩培養して感染アッセイに用いた。

細胞融合アッセイ：細胞融合を定量化するために我々は、 $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) の $\alpha$ -complementationを利用した改良型細胞融合アッセイを使用した (志田等、論文作成中)。

$\beta$ -galの $\alpha$ -subunitとenv 蛋白質は、遺伝子組み換えワクシニアウイルスによりエフェクター細胞である HeLaS3 細胞 (24 ウェルプレート、 $1 \times 10^5$  細胞 / ウェル) に導入した。

ヒトCD4、 $\beta$ -galの $\omega$ -subunit、T7 RNA polymerase は、遺伝子組み換えワクシニアウイルスによりターゲット細胞であるNIH3T3細胞 (24 ウェルプレート  $5 \times 10^4$ 細胞 / ウェル) に導入し、ケモカイン受容体はLipofectamine を用いてターゲット細胞にトランスフェクトした。トランスフェクト後16時間目に、エフェクター細胞とターゲット細胞を $0.5\text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ を含む PBSで洗浄し、ワクシニアウイルスにより引き起こされる非特異的な細胞融合を抑制するために抗ワクシニアウイルス抗体である2D5 で処理した。エフェクター細胞を $3\text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ を含む Hanks の緩衝液 (pH7.6)に懸濁し、24ウェルプレート中でターゲット細胞に重層した後、融合を開始するために $1,300\text{ rpm}$  で5分間遠心した。

遠心後に細胞を5%  $\text{CO}_2$ 存在下で  $37^\circ\text{C}$ 12時間培養した。細胞融合が起きた場合、融合細胞の細胞質に含まれる $\beta$ -galの $\alpha$ -subunitと $\omega$ -subunitが会合し、 $\alpha$ -c complementationにより活性型 $\beta$ -gal酵素になるので、培養液を除いた後に、 $\beta$ -g

alの基質であるchlorophenolred-b-D-galactopyranoside (Boehringer Mannheim) を8 mMと、45 mM 2-メルカプトエタノール、1 mM  $MgCl_2$ 、100 mM Hepes pH8.0、0.5% NP40、DNase I 0.1 mg/mlを含む溶液を1ウェルにつき200  $\mu$ l添加し、37 °Cで30分間反応後、反応を停止するために2% SDS を1ウェルにつき200  $\mu$ l添加した。反応液中の $\beta$ -gal活性を定量するため波長590nmにおける吸光度を測定した。

感染アッセイ：ヒトCD4 と受容体を発現するヒト SW480或いは HOS細胞を12ウェルプレートで培養した。各ウェルに、HIV-1ウイルスを含む培養液 (reverse transcriptase(RT) 活性は、SF162 が $2 \times 10^6$  RT/ mL、NL432env162、NL432V3-162、IIIBが $5 \times 10^6$  RT/ mL、NL432 が  $3 \times 10^6$  RT/mL) を添加し、5%  $CO_2$ 存在下、37°Cで2時間培養した後、1ウェルあたり2.5 mlの培養液を添加した。感染後4日目にReporter lysis buffer (Promega) を1ウェルあたり400  $\mu$ l添加し、-80 °Cで凍結後に融解した。融解したサンプルをエッペンドルフチューブへ移し、4 °C、5分間 12,000 rpm で遠心した後、上清に含まれる $\beta$ -gal活性を発光 $\beta$ -gal検出キット (Clontech社) で測定した。

## 結果

まず第一に、我々は、マウス CXCR4が HIV-1の envを介した膜融合を支持するかどうかを検討するために、env 蛋白質を発現するエフェクター細胞 (HeLaS3細胞) とヒト CD4と受容体を発現するターゲット細胞 (NIH3T3細胞) との融合により $\beta$ -Galの活性化が起こるアッセイシステムを用いて実験した。このアッセイでは、エフェクター細胞であるHeLaS3細胞には遺伝子組み換えワクシニアウイルスを感染させて $\beta$ -Galの $\alpha$ -subunitとHIV-1のenv 蛋白質を発現させ、ターゲット細胞である NIH3T3 細胞には遺伝子組み換えワクシニアウイルスを感染させて、 $\beta$ -Galの $\omega$ -subunit、T7 polymerase、ヒト CD4を発現させた。ウイルス感染後



に NIH3T3 細胞には更にヒト CXCR4、ヒトCCR5或いは、マウス CXCR4を含むプラスミドをトランスフェクトした。一晚培養後に、エフェクター細胞とターゲット細胞を混合して培養した。細胞融合が起こると、融合細胞の細胞質に含まれる $\beta$ -Galの $\alpha$ -subunitと $\omega$ -subunitが会合し、 $\beta$ -Galが活性化する。図8に示すように、T細胞株指向性 HIV-1である NL432由来のenv 蛋白質を発現するHeLaS3細胞はヒトCXCR4 とヒト CD4を発現するNIH 3T3 細胞とは融合するが、ヒトCCR5とヒト CD4を発現するNIH 3T3 細胞とは融合しなかった。

驚いた事に、NL432 由来のenv 蛋白質を発現するHeLaS3細胞はマウス CXCR4とヒト CD4を発現する細胞にも同様に融合した。単球指向性 HIV-1である SF162由来のenv 蛋白質を発現するHeLaS3細胞はヒト CCR5 とヒト CD4を発現するNIH 3T3 細胞とは融合するが、ヒト或いはマウスCXCR4 とヒト CD4を発現するNIH 3T3 細胞とは融合しなかった。

第二に我々は、マウス CXCR4を発現した細胞にウイルスが感染するかを検討した。ヒト CXCR4と CD4を発現したマウス細胞ではNIH3T3細胞も含めHIV-1 の複製効率が低いので、ヒト小腸上皮細胞由来のSW480 細胞、骨芽細胞由来の HOS細胞、グリア細胞由来のU87MG 細胞の3 種のヒト細胞株をウィルス感染のターゲット細胞として使用した。それらの細胞にはHIV-1 のLTR をプロモーターとして持つレポーター遺伝子(lacZ)をトランスフェクトした。ウイルスが細胞に感染すると、HIV-1由来の転写活性化因子であるTat 蛋白質が発現され、LTR に作用してlacZの発現を誘導する。それらの細胞に、更にヒト CD4とケモカイン受容体をトランスフェクトした後に、T細胞株指向性ウイルス株(NL432、IIIB)或いは、単球指向性ウイルス株(SF162)を感染させた。図9に示すように、NL432 とIIIBはマウスCXCR4 とヒトCD4 を発現するSW480 にもヒト CXCR4とヒトCD4 を発現するSW480 にも同様に感染した。この結果は、上記の融合アッセイの結果と一致するものであった。しかし、ヒト CCR2bやCCR5を CXCR4の代わりに発現した場合はそれらのウイルスは感染しなかった。

一方SF162 は、ヒト CCR5 とヒトCD4 を発現するSW480 には感染したが、マウスCXCR4 とヒトCD4 を発現する細胞やヒト CXCR4とヒトCD4 を発現する細胞には感染しなかった。また、HOS 細胞やU87MG 細胞をSW480 細胞の代わりに用いても同様の結果であった（図10と図11）。すなわち、マウス CXCR4は、T細胞株指向性HIV-1 のターゲット細胞へのエントリーを支持する事、そして、ヒト細胞におけるプロウィルスの DNAの合成、ゲノムDNA への組み込み、ウイルスの発現に影響しない事が示唆された。

ところで、ヒト CXCR4を介する HIV-1のエントリーは、env蛋白のV3ループに対する単クローン抗体によって阻害されることが明らかとなっている。そこで、我々はマウス CXCR4の機能がヒト CXCR4と同様であることを確認するために、（T細胞株指向性ウイルス株の）env 蛋白（gp120）の V3 ループがマウス CXCR4を介する HIV-1エントリーにも必要であるかを検討した。そのために、ヒトCD4 とケモカイン受容体を発現するSW480 細胞に、NL432 とSF162 のキメラウィルスのクローンであるNL432env-162或いはNL432V3-162 を感染させた。図12に示すように、NL432env-162 はT細胞株指向性ウイルス株NL432 のenv 領域を単球指向性 HIV-1であるSF162 のものに置換したプロウィルスクローンであり、NL432V3-162 は、NL432 のenv のV3ループをSF162 のものに置換したプロウィルスクローンである。NL432はマウス CXCR4とヒト CD4を発現するSW480 に感染したが、NL432env-162及び NL432V3-162はそれらの細胞に感染しなかった（図13）。

一方、NL432env-162とNL432V3-162 は、ヒトCCR5とヒト CD4を発現するSW480 細胞には感染した（図13）。これらの結果から、NL432 のenv のV3ループがマウスCXCR4 でもヒトCXCR4 の場合と同様にウィルスのエントリーに必要であることが明らかになった。

## 論議

以上の研究より、マウス CXCR4 がT細胞株指向性HIV-1 のenv を介する細胞

膜融合とT細胞株指向性HIV-1の感染を支持する事が明らかとなった。これらの結果はマウス CXCR4がHIV-1の感染に対する種特異的な障壁ではないことを示唆するものである。これまでの研究で、ヒト CD4を NIH3T3 やT細胞クローン 3DTなどのマウスのリンパ球或いは非リンパ球細胞株に発現しても、HIV-1は吸着は起こるがエントリは起こらない事が明らかとなっていた。この結果の解釈の1つは、ヒト CD4を発現させたマウス細胞表面にCXCR4が発現していないというものである。実際、マウス PBSF/SDF-1 刺激は、NIH3T3細胞の細胞内カルシウム濃度の変化を誘導しない。しかし、マウス CXCR4は、CD4 とCD8 が共に陽性の胸腺細胞や、CD4 或いはCD8 のいずれかが陽性の胸腺細胞には発現している。従って、実験に用いられた3DT細胞がCXCR4を発現しているかどうかを決定することが（上記の解釈が正しいかを検証する上で）重要である。

最近の研究で単球指向性HIV-1の受容体であるヒトCCR5のマウス相同体（マウスCCR5）はHIV-1のエントリーを支持しない事が明らかとなった。この結果は単球指向性HIV-1に対する受容体とT細胞株指向性HIV-1に対する受容体とで種特異性が異なることを示唆している。この差異は、CCR5を含む他のケモカイン受容体と比較してCXCR4は種間でアミノ酸配列が高度に保存されている事が原因であるかもしれない。マウス CXCR4のアミノ酸配列はヒト CXCR4と90%一致しているが、CCR5やCXCR2では、マウスとヒトでそれぞれ82%、71%しか一致していない。CXCR4の種間における高度な保存は、CCR5のリガンドであるMIP-1  $\alpha$ 、MIP- $\beta$ 、RANTES など他のケモカインと比較すると、CXCR4のリガンドであるPBSF/SDF-1はユニークな機能を持つという事実を反映している。PBSF/SDF-1以外のケモカインは炎症における白血球の遊走に関与していると考えられているのに対し、PBSF/SDF-1は、造血や心臓形成など生体発生に必要な機能を持っている。

これまでの研究と、ヒト CD4とケモカイン受容体を発現したマウス細胞株 NIH3T3 はHIV-1 エントリを支持するものの、ヒトの細胞と比較してウイルス粒子の産生効率が低いという事実から、マウス細胞にはHIV-1の複製に必要な細胞内分

子が欠損していると考えられる。しかし、種特異的な障壁の原因となる分子のヒト遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製することによって HIV-1 感染のモデルマウスを開発できるであろう。我々の結果は、ヒト CXCR4 遺伝子を HIV-1 感染のモデルマウスに導入する必要はない事を明らかにした。また CXCR4 の生理的な発現の方が AIDS 発症に至る単球指向性 HIV-1 から T 細胞株指向性 HIV-1 への移行の開始や進行を研究するのに適しているので、HIV-1 感染の全過程をシミュレートするための動物モデルを開発する上で有益な情報を提供した。

---

#### 産業上の利用可能性

本発明により、AIDS の治療薬及び HIV-1 の感染の作用機序等の研究に有用な、新規なマウス CXCR4 ケモカインレセプター遺伝子、該遺伝子にコードされるポリペプチド、該ポリペプチドの発現ベクター、該発現ベクターを導入した形質転換体、前記ポリペプチドに対する単クローン抗体、さらには前記形質転換体を用いる前記ポリペプチドの生産方法、さらには、前記レセプターのアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法、及び HIV-1 感染阻害剤のスクリーニング方法の提供が可能となった。

## 配列表

配列番号：1

配列の長さ：1 8 7 7

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

## 起源

生物名：マウス

## 配列：

CCATCCTAAT ACGACTCACT ATA 23  
GGGCTCGAGC GGCCGCCCGG GCAGGTGCAG GTAGCAGTGA CCCTCTGA 71  
GGCGTTTGGTGCTCCGGTAACCACCACGGCTGTAGAGCGAGTGTTGCC 119  
ATGGAACCGATCAGTGTGAGTATATACACTTCTGATAACTACTCTGAA 167  
MetGluProIleSerValSerIleTyrThrSerAspAsnTyrSerGlu  
1 5 10 15  
GAAGTGGGGTCTGGAGACTATGACTCCAACAAGGAACCCTGCTTCCGG 215  
GluValGlySerGlyAspTyrAspSerAsnLysGluProCysPheArg  
20 25 30  
GATGAAAACGTCCATTTCAATAGGATCTTCCTGCCCACCATCTACTTC 263  
AspGluAsnValHisPheAsnArgIlePheLeuProThrIleTyrPhe  
35 40 45  
ATCATCTTCTTGACTGGCATAGTCGGCAATGGATTGGTGATCCTGGTC 311  
IleIlePheLeuThrGlyIleValGlyAsnGlyLeuValIleLeuVal  
50 55 60  
ATGGGTTACCAGAAGAAGCTAAGGAGCATGACGGACAAGTACCGGCTG 359

MetGlyTyrGlnLysLysLeuArgSerMetThrAspLysTyrArgLeu  
65 70 75 80  
CACCTGTCAGTGGCTGACCTCCTCTTTGTCATCACACTCCCCTTCTGG 407  
HisLeuSerValAlaAspLeuLeuPheValIleThrLeuProPheTrp  
85 90 95  
GCAGTTGATGCCATGGCTGACTGGTACTTTGGGAAATTTTGTGTAAG 455  
AlaValAspAlaMetAlaAspTrpTyrPheGlyLysPheLeuCysLys  
100 105 110

---

GCTGTCCATATCATCTACACTGTCAACCTCTACAGCAGCGTTCTCATC 503  
AlaValHisIleIleTyrThrValAsnLeuTyrSerSerValLeuIle  
115 120 125  
CTGGCCTTCATCAGCCTGGACCGGTACCTCGCCATTGTCCACGCCACC 551  
LeuAlaPheIleSerLeuAspArgTyrLeuAlaIleValHisAlaThr  
130 135 140  
AACAGTCAAAGGCCAAGGAAACTGCTGGCTGAAAAGGCAGTCTATGTG 599  
AsnSerGlnArgProArgLysLeuLeuAlaGluLysAlaValTyrVal  
145 150 155 160  
GGCGTCTGGATCCCAGCCCTCCTCCTGACTATACCTGACTTCATCTTT 647  
GlyValTrpIleProAlaLeuLeuLeuThrIleProAspPheIlePhe  
165 170 175  
GCCGACGTCAGCCAGGGGACATCAGTCAGGGGGATGACAGGTACATC 697  
AlaAspValSerGlnGlyAspIleSerGlnGlyAspAspArgTyrIle  
180 185 190  
TGTGACCGCCTTTACCCCGATAGCCTGTGGATGGTGGTGTTC AATTC 743  
CysAspArgLeuTyrProAspSerLeuTrpMetValValPheGlnPhe  
195 200 205

CAGCATATAATGGTGGGTCTCATCCTGCCCCGGCATCGTCATCCTCTCC 791  
GlnHisIleMetValGlyLeuIleLeuProGlyIleValIleLeuSer  
210 215 220  
TGTTACTGCATCATCTCTAAGCTGTCACACTCCAAGGGCCACCAG 839  
CysTyrCysIleIleIleSerLysLeuSerHisSerLysGlyHisGln  
225 230 235 240  
AAGCGCAAGGCCCTCAAGACGACAGTCATCCTCATCCTAGCTTTCTTT 887  
LysArgLysAlaLeuLysThrThrValIleLeuIleLeuAlaPhePhe  
245 250 255  
GCCTGCTGGCTGCCATATTATGTGGGGATCAGCATCGACTCCTTCATC 935  
AlaCysTrpLeuProTyrTyrValGlyIleSerIleAspSerPheIle  
260 265 270  
CTTTTGGGAGTCATCAAGCAAGGATGTGACTTCGAGAGCATTGTGCAC 983  
LeuLeuGlyValIleLysGlnGlyCysAspPheGluSerIleValHis  
275 280 285  
AAGTGGATCTCCATCACAGAGGCCCTCGCCTTCTTCCACTGTTGCCTG 1031  
LysTrpIleSerIleThrGluAlaLeuAlaPhePheHisCysCysLeu  
290 295 300  
AACCCCATCCTCTATGCCTTCCTCGGGGCCAAGTTCAAAGCTCTGCC 1079  
AsnProIleLeuTyrAlaPheLeuGlyAlaLysPheLysSerSerAla  
305 310 315 320  
CAGCATGCACTCAACTCCATGAGCAGAGGCTCCAGCCTCAAGATCCTT 1127  
GlnHisAlaLeuAsnSerMetSerArgGlySerSerLeuLysIleLeu  
325 330 335  
TCCAAAGGAAAGCGGGGTGGACACTCTTCGTCTCCACGGAGTCAGAA 1175  
SerLysGlyLysArgGlyGlyHisSerSerValSerThrGluSerGlu

340 345 350  
TCCTCCAGTTTTCACTCCAGCTAACCCCTTATGCAAAGACTTATATAAT 1223  
SerSerSerPheHisSerSer  
355 359  
ATATATATATATATGATAAAGAACTTTTTTATGTTACACATTTTCCAG 1271  
ATATAAGAGACTGACCAGTCTTGTACAGTTTTTTTTTTTTTTAATTG 1319  
ACTGTTGGGAGTTTATGTTCCCTCTAGTTTTTGTGAGGTTTGACTTAAT 1367  
TTATATAAATATTGTTTTTTGTTTGTTCATGTGAATGAGCGTCTAGG 1415  
CAGGACCTGTGGCCAAGTTCTTAGTAGCTGTTTATCTGTGTGTAGGAC 1463  
TGTAGAACTGTAGAGGAAGAACTGAACATTCCAGAATGTGTGGTAAA 1511  
TTGAATAAAGCTAGCCGTGATCCTCAGCTGTTGCTGCATAATCTCTTC 1559  
ATTCCGAGGAGCACCCACCCACCCACCCACCCACCCATTCTTAA 1607  
ATTGTTTGTTATGCTGTGTGATGGTTTGGTTTGTGTTTGTGTTGT 1655  
TGTTGTTGTTTTTTTTCTGTAAAAGATGGCACTTAAACCAAAGCC 1703  
TGAAATGGTGGTAGAAATGCTGGGGTTTTTTTTGTTTGTGTTTGT 1751  
CAGTTTTCAAGAGTAGATTGACTTCAGTCCCTACAAATGTACAGTCTT 1799  
GTATTACATTGTTAATAAAAGTCAATGATAAACTAAAAAAAAAAAAA 1847  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1877

配列番号 : 2

配列の長さ : 6 9 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源



生物名：マウス

配列：

CTG 3

Leu

1

CACCTGTCAGTGGCTGACCTCCTCTTTGTCATCACACTCCCCTTCTGG 51

HisLeuSerValAlaAspLeuLeuPheValIleThrLeuProPheTrp

5

10

15

GCAGTTGATGCCATGGCTGACTGGTACTTTGGGAAATTTTGTGTAAG 99

AlaValAspAlaMetAlaAspTrpTyrPheGlyLysPheLeuCysLys

20

25

30

GCTGTCCATATCATCTACACTGTCAACCTCTACAGCAGCGTTCTCATC 147

AlaValHisIleIleTyrThrValAsnLeuTyrSerSerValLeuIle

35

40

45

CTGGCCTTCATCAGCCTGGACCGGTACCTCGCCATTGTCCACGCCACC 195

LeuAlaPheIleSerLeuAspArgTyrLeuAlaIleValHisAlaThr

50

55

60

65

AACAGTCAAAGGCCAAGGAACTGCTGGCTGAAAAGGCAGTCTATGTG 243

AsnSerGlnArgProArgLysLeuLeuAlaGluLysAlaValTyrVal

70

75

80

GGCGTCTGGATCCCAGCCCTCCTCCTGACTATACCTGACTTCATCTTT 291

GlyValTrpIleProAlaLeuLeuLeuThrIleProAspPheIlePhe

85

90

95

GCCGACGTCAGCCAGGGGACATCAGTCAGGGGGATGACAGGTACATC 339

AlaAspValSerGlnGlyAspIleSerGlnGlyAspAspArgTyrIle

100

105

110

TGTGACCGCCTTTACCCCGATAGCCTGTGGATGGTGGTGTTC AATTC 387

CysAspArgLeuTyrProAspSerLeuTrpMetValValPheGlnPhe

115 120 125

CAGCATATAATGGTGGGTCTCATCCTGCCCGGCATCGTCATCCTCTCC 435

GlnHisIleMetValGlyLeuIleLeuProGlyIleValIleLeuSer

130 135 140 145

TGTTACTGCATCATCATCTCTAAGCTGTCACACTCCAAGGGCCACCAG 483

CysTyrCysIleIleIleSerLysLeuSerHisSerLysGlyHisGln

150 155 160

AAGCGCAAGGCCCTCAAGACGACAGTCATCCTCATCCTAGCTTTCTTT 531

LysArgLysAlaLeuLysThrThrValIleLeuIleLeuAlaPhePhe

165 170 175

GCCTGCTGGCTGCCATATTATGTGGGGATCAGCATCGACTCCTTCATC 579

AlaCysTrpLeuProTyrTyrValGlyIleSerIleAspSerPheIle

180 185 190

CTTTTGGGAGTCATCAAGCAAGGATGTGACTTCGAGAGCATTGTGCAC 627

LeuLeuGlyValIleLysGlnGlyCysAspPheGluSerIleValHis

195 200 205

AAGTGGATCTCCATCACAGAGGCCCTCGCCTTCTTCCACTGTTGCCTG 675

LysTrpIleSerIleThrGluAlaLeuAlaPhePheHisCysCysLeu

210 215 220 225

AACCCCATCCTCTAT 690

AsnProIleLeuTyr

230

配列番号 : 3

配列の長さ : 6 8 5

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : マウス

配列 :

```
CCATCCTAATACGACTCACTATA 23
GGGCTCGAGCGGCCGCCGGCAGGTGCAGGTAGCAGTGACCCTCTGA 71
GGCGTTTGGTGCTCCGGTAACCACCACGGCTGTAGAGCGAGTGTTGCC 119
ATGGAACCGATCAGTGTGAGTATATACACTTCTGATAACTACTCTGAA 167
MetGluProlIleSerValSerIleTyrThrSerAspAsnTyrSerGlu
  1           5           10           15
GAAGTGGGGTCTGGAGACTATGACTCCAACAAGGAACCCTGCTTCCGG 215
GluValGlySerGlyAspTyrAspSerAsnLysGluProCysPheArg
           20           25           30
GATGAAAACGTCCATTTCAATAGGATCTTCCTGCCCACCATCTACTTC 263
AspGluAsnValHisPheAsnArgIlePheLeuProThrIleTyrPhe
           35           40           45
ATCATCTTCTTGACTGGCATAGTCGGCAATGGATTGGTGATCCTGGTC 311
IleIlePheLeuThrGlyIleValGlyAsnGlyLeuValIleLeuVal
           50           55           60
ATGGGTACCAGAAGAAGCTAAGGAGCATGACGGACAAGTACCGGCTG 359
MetGlyTyrGlnLysLysLeuArgSerMetThrAspLysTyrArgLeu
           65           70           75           80
```

CACCTGTCAGTGGCTGACCTCCTCTTTGTCATCACACTCCCCTTCTGG 407  
HisLeuSerValAlaAspLeuLeuPheValIleThrLeuProPheTrp  
85 90 95  
GCAGTTGATGCCATGGCTGACTGGTACTTTGGGAAATTTTGTGTAAG 455  
AlaValAspAlaMetAlaAspTrpTyrPheGlyLysPheLeuCysLys  
100 105 110  
GCTGTCCATATCATCTACACTGTCAACCTCTACAGCAGCGTTCTCATC 503  
AlaValHisIleIleTyrThrValAsnLeuTyrSerSerValLeuIle  
115 120 125  
CTGGCCTTCATCAGCCTGGACCGGTACCTCGCCATTGTCCACGCCACC 551  
LeuAlaPheIleSerLeuAspArgTyrLeuAlaIleValHisAlaThr  
130 135 140  
AACAGTCAAAGGCCAAGGAACTGCTGGCTGAAAAGGCAGTCTATGTG 599  
AsnSerGlnArgProArgLysLeuLeuAlaGluLysAlaValTyrVal  
145 150 155 160  
GGCGTCTGGATCCCAGCCCTCCTCCTGACTATACCTGACTTCATCTTT 647  
GlyValTrpIleProAlaLeuLeuLeuThrIleProAspPheIlePhe  
165 170 175  
GCCGACGTCAGCCAGGGGGACATCAGTCAGGGGGATGA 685  
AlaAspValSerGlnGlyAspIleSerGlnGlyAsp  
180 185

配列番号 : 4

配列の長さ : 1 6 9 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：マウス

配列：

ATATACACTTCTGATAACTACTCTGAA 27

IleTyrThrSerAspAsnTyrSerGlu

1 5

GAAGTGGGGTCTGGAGACTATGACTCCAACAAGGAACCCTGCTTCCGG 75

GluValGlySerGlyAspTyrAspSerAsnLysGluProCysPheArg

10 15 20 25

GATGAAAACGTCCATTTCAATAGGATCTTCCTGCCCACCATCTACTTC 123

AspGluAsnValHisPheAsnArgIlePheLeuProThrIleTyrPhe

30 35 40

ATCATCTTCTTGACTGGCATAGTCGGCAATGGATTGGTGATCCTGGTC 171

IleIlePheLeuThrGlyIleValGlyAsnGlyLeuValIleLeuVal

45 50 55

ATGGGTTACCAGAAGAAGCTAAGGAGCATGACGGACAAGTACCGGCTG 219

MetGlyTyrGlnLysLysLeuArgSerMetThrAspLysTyrArgLeu

60 65 70

CACCTGTCAGTGGCTGACCTCCTCTTTGTCATCACACTCCCCTTCTGG 267

HisLeuSerValAlaAspLeuLeuPheValIleThrLeuProPheTrp

75 80 85

GCAGTTGATGCCATGGCTGACTGGTACTTTGGGAAATTTTGTGTAAG 315

AlaValAspAlaMetAlaAspTrpTyrPheGlyLysPheLeuCysLys

90 95 100 105

GCTGTCCATATCATCTACACTGTCAACCTCTACAGCAGCGTTCTCATC 363

AlaValHisIleIleTyrThrValAsnLeuTyrSerSerValLeuIle

110 115 120

CTGGCCTTCATCAGCCTGGACCGGTACCTCGCCATTGTCCACGCCACC 411

LeuAlaPheIleSerLeuAspArgTyrLeuAlaIleValHisAlaThr

125 130 135

AACAGTCAAAGGCCAAGGAACTGCTGGCTGAAAAGGCAGTCTATGTG 459

AsnSerGlnArgProArgLysLeuLeuAlaGluLysAlaValTyrVal

140 145 150

GGCGTCTGGATCCCAGCCCTCCTCCTGACTATACCTGACTTCATCTTT 507

GlyValTrpIleProAlaLeuLeuLeuThrIleProAspPheIlePhe

155 160 165

GCCGACGTCAGCCAGGGGACATCAGTCAGGGGGATGACAGGTACATC 555

AlaAspValSerGlnGlyAspIleSerGlnGlyAspAspArgTyrIle

170 175 180 185

TGTGACCGCCTTTACCCGATAGCCTGTGGATGGTGGTGTTC AATC 603

CysAspArgLeuTyrProAspSerLeuTrpMetValValPheGlnPhe

190 195 200

CAGCATATAATGGTGGGTCTCATCCTGCCCGGCATCGTCATCCTCTCC 651

GlnHisIleMetValGlyLeuIleLeuProGlyIleValIleLeuSer

205 210 215

TGTTACTGCATCATCATCTCTAAGCTGTCACACTCCAAGGGCCACCAG 699

CysTyrCysIleIleIleSerLysLeuSerHisSerLysGlyHisGln

220 225 230

AAGCGCAAGGCCCTCAAGACGACAGTCATCCTCATCCTAGCTTTCTTT 747

LysArgLysAlaLeuLysThrThrValIleLeuIleLeuAlaPhePhe

235 240 245  
GCCTGCTGGCTGCCATATTATGTGGGGATCAGCATCGACTCCTTCATC 795  
AlaCysTrpLeuProTyrTyrValGlyIleSerIleAspSerPheIle  
250 255 260 265  
CTTTTGGGAGTCATCAAGCAAGGATGTGACTTCGAGAGCATTGTGCAC 843  
LeuLeuGlyValIleLysGlnGlyCysAspPheGluSerIleValHis  
270 275 280  
AAGTGGATCTCCATCACAGAGGCCCTCGCCTTCTTCCACTGTTGCCTG 891  
LysTrpIleSerIleThrGluAlaLeuAlaPhePheHisCysCysLeu  
285 290 295  
AACCCCATCCTCTATGCCTTCCTCGGGGCCAAGTTCAAAGCTCTGCC 939  
AsnProIleLeuTyrAlaPheLeuGlyAlaLysPheLysSerSerAla  
300 305 310  
CAGCATGCACTCAACTCCATGAGCAGAGGCTCCAGCCTCAAGATCCTT 987  
GlnHisAlaLeuAsnSerMetSerArgGlySerSerLeuLysIleLeu  
315 320 325  
TCCAAAGGAAAGCGGGGTGGACACTCTTCCGTCTCCACGGAGTCAGAA 1035  
SerLysGlyLysArgGlyGlyHisSerSerValSerThrGluSerGlu  
330 335 340 345  
TCCTCCAGTTTTCACTCCAGCTAACCCCTTATGCAAAGACTTATATAAT 1083  
SerSerSerPheHisSerSer  
350  
ATATATATATATATGATAAAGAACTTTTTTATGTTACACATTTTCCAG 1131  
ATATAAGAGACTGACCAGTCTTGACAGTTTTTTTTTTTTTTTAATTG 1179  
ACTGTTGGGAGTTTATGTTCCCTCTAGTTTTTGTGAGGTTTGACTTAAT 1227  
TTATATAAATATTGTTTTTGTGTTTCATGTGAATGAGCGTCTAGG 1275

CAGGACCTGTGGCCAAGTTCTTAGTAGCTGTTTATCTGTGTGTAGGAC 1323  
TGTAGAACTGTAGAGGAAGAACTGAACATTCCAGAATGTGTGGTAAA 1371  
TTGAATAAAGCTAGCCGTGATCCTCAGCTGTTGCTGCATAATCTCTTC 1419  
ATTCCGAGGAGCACCCCACCCCCACCCCCACCCCCACCCCATTCTTAA 1467  
ATTGTTTGGTTATGCTGTGTGATGGTTTGGTTTGGTTTTTTTTTGTGT 1515  
TGTTGTTGTTTTTTTTTCTGTAAAAGATGGCACTTAAACCAAAGCC 1563  
TGAAATGGTGGTAGAAATGCTGGGGTTTTTTTTGTTTGTGTTTTTT 1611  
CAGTTTTCAAGAGTAGATTGACTTCAGTCCCTACAAATGTACAGTCTT 1659

---

GTATTACATTGTTAATAAAAGTCAATGATAAACTT 1694

配列番号 : 5

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列の特徴 : 13、15 (イノシン)

配列 :

CTSMGTTTGK CMNTNKCYGA

20

配列番号 : 6

配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)



配列の特徴： 8、 9、 1 7 (イノシン)

配列：

TAGAKSANNG GRTTSANRCA RCAGTG

26

配列番号： 7

配列の長さ： 2 5

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 (合成DNA)

配列：

TCATCCCCCT GACTGATGTC CCCCT

25

配列番号： 8

配列の長さ： 2 7

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 (合成DNA)

配列：

CCATCCTAAT ACGACTCACT ATAGGGC

27

配列番号： 9

配列の長さ： 3 0

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CGCGTCGACC ACAACATGCT GTCCACATCA

30

配列番号：1 0

配列の長さ：3 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CGCTCTAGAT TATAAACCAG CCGAGACTTC

30

配列番号：1 1

配列の長さ：2 9

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CGCGTCGACG TTACCATGGA GGGGATCAG

29

配列番号：1 2

配列の長さ：3 2

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CGCGCGGCCG CTTAGCTGGA GTGAAACTT GA 32

配列番号：1 3

配列の長さ：2 7

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TAGCGGCCGC GTTGCCATGG AACCGAT 27

配列番号：1 4

配列の長さ：2 7

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GCGTCGACTA AGGGTTAGCT GGAGTGA 27

配列番号：1 5

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CTGCACCTGT CAGTGGCTGA

20

配列番号：16

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TAGATGAGGG GGATTGAGAC AACAGTG

27

配列番号：17

配列の長さ：359

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：マウス

配列：

MetGluProIleSerValSerIleTyrThrSerAspAsnTyrSerGlu

1

5

10

15

GluValGlySerGlyAspTyrAspSerAsnLysGluProCysPheArg  
20 25 30  
AspGluAsnValHisPheAsnArgIlePheLeuProThrIleTyrPhe  
35 40 45  
IleIlePheLeuThrGlyIleValGlyAsnGlyLeuValIleLeuVal  
50 55 60  
MetGlyTyrGlnLysLysLeuArgSerMetThrAspLysTyrArgLeu  
65 70 75 80  
HisLeuSerValAlaAspLeuLeuPheValIleThrLeuProPheTrp  
85 90 95  
AlaValAspAlaMetAlaAspTrpTyrPheGlyLysPheLeuCysLys  
100 105 110  
AlaValHisIleIleTyrThrValAsnLeuTyrSerSerValLeuIle  
115 120 125  
LeuAlaPheIleSerLeuAspArgTyrLeuAlaIleValHisAlaThr  
130 135 140  
AsnSerGlnArgProArgLysLeuLeuAlaGluLysAlaValTyrVal  
145 150 155 160  
GlyValTrpIleProAlaLeuLeuLeuThrIleProAspPheIlePhe  
165 170 175  
AlaAspValSerGlnGlyAspIleSerGlnGlyAspAspArgTyrIle  
180 185 190  
CysAspArgLeuTyrProAspSerLeuTrpMetValValPheGlnPhe  
195 200 205  
GlnHisIleMetValGlyLeuIleLeuProGlyIleValIleLeuSer  
210 215 220

CysTyrCysIleIleIleSerLysLeuSerHisSerLysGlyHisGln

225                    230                    235                    240

LysArgLysAlaLeuLysThrThrValIleLeuIleLeuAlaPhePhe

245                    250                    255

AlaCysTrpLeuProTyrTyrValGlyIleSerIleAspSerPheIle

260                    265                    270

LeuLeuGlyValIleLysGlnGlyCysAspPheGluSerIleValHis

275                    280                    285

---

LysTrpIleSerIleThrGluAlaLeuAlaPhePheHisCysCysLeu

290                    295                    300

AsnProIleLeuTyrAlaPheLeuGlyAlaLysPheLysSerSerAla

305                    310                    315                    320

GlnHisAlaLeuAsnSerMetSerArgGlySerSerLeuLysIleLeu

325                    330                    335

SerLysGlyLysArgGlyGlyHisSerSerValSerThrGluSerGlu

340                    345                    350

SerSerSerPheHisSerSer

355                    359

## 請 求 の 範 囲

1. 配列表の配列番号：17に記載のアミノ酸配列の全部又は一部からなるポリペプチド、又は該ポリペプチドを含むポリペプチドであって、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドをコードするDNA。
2. 配列表の配列番号：17に記載のアミノ酸配列の全部又は一部のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも一つが生じ、かつマウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドをコードするDNA。
3. 配列表の配列番号：1に記載の塩基配列の全部又は一部からなるDNA、又は該DNAを含むDNAであって、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドをコードするDNA。
4. 配列表の配列番号：1に記載の塩基配列の全部又は一部のDNA、又は該DNAを含むDNAであって、1以上の塩基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも一つが生じ、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドをコードするDNA。
5. 請求項1～4いずれか記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドをコードするDNA。
6. 請求項1～5いずれか記載のDNAによりコードされるポリペプチドであって、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチド。

7. 配列表の配列番号：17に記載のアミノ酸配列の全部又は一部からなるポリペプチド、又は該ポリペプチドを含むポリペプチドであって、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチド。

8. 配列表の配列番号：17に記載のアミノ酸配列の全部又は一部のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換の少なくとも一つが生じ、かつマウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチド。

---

9. マウスB前駆細胞株DW34に由来する、請求項6～8いずれか記載のポリペプチド。

10. 請求項1～5いずれか記載のDNAを含む発現ベクター。

11. 請求項10記載の発現ベクターを宿主に導入して得られる形質転換体。

12. 宿主が哺乳類細胞株である請求項11記載の形質転換体。

13. 請求項11又は12記載の形質転換体を、請求項10記載の発現ベクターの発現可能な条件下で培養することを特徴とする、マウスPBSF/SDF-1と結合可能なレセプター活性を有するポリペプチドの生産方法。

14. 請求項6～9いずれか記載のポリペプチドに対する単クローン抗体。

15. マウスPBSF/SDF-1を含有し、AIDS発症阻害剤又はHIV-1感染阻



害剤として用いられる医薬組成物。

16. 請求項6～9いずれか記載のポリペプチド及びヒトCD4タンパク質を発現する細胞。

17. (a) 請求項6～9いずれか記載のポリペプチドを発現する細胞又は請求項16記載の細胞；ヒトT細胞株指向性HIV-1；及びスクリーニングの対象となる物質を混合してインキュベートを行う工程、及び

(b) 該細胞における HIV-1の局在性を分析する工程、  
を含んでなることを特徴とする、AIDS発症阻害剤又はHIV-1感染阻害剤をスクリーニングする方法。

18. HIV-1の局在性を分析する工程を、ヒトT細胞株指向性HIV-1に対するモノクローナル抗体を用いて行う、請求項17記載の方法。

19. (a) 請求項6～9いずれか記載のポリペプチドを発現する細胞又は請求項16記載の細胞；HIV-1エンベロープタンパク質を発現する細胞；及びスクリーニングの対象となる物質を混合してインキュベートを行う工程、及び

(b) HIV-1エンベロープタンパク質を発現する細胞と該細胞との融合性を測定する工程、

を含んでなることを特徴とする、AIDS発症阻害剤又はHIV-1感染阻害剤をスクリーニングする方法。

20. (a) 請求項6～9いずれか記載のポリペプチドを発現する細胞又は請求項16記載の細胞；マウス又はヒトPBSF/SDF-1；及びスクリーニングの対象となる物質を混合してインキュベートを行う工程、及び

(b) 該細胞内のカルシウムイオン濃度を測定する、及び／又は発現したポリペプチドと該マウス又はヒトPBSF/SDF-1との結合活性を測定することを特徴とする、AIDS発症阻害剤若しくはHIV-1感染阻害剤、又は該PBSF/SDF-1のアゴニスト若しくはアンタゴニストをスクリーニングする方法。

21. 該アンタゴニストが造血幹細胞遊離促進剤である請求項20記載の方法。

22. 請求項6～9いずれか記載のポリペプチドを発現する細胞又は請求項16記載の細胞を含む、AIDS発症又はHIV-1感染を検出するためのキット。

23. (a) 請求項6～9いずれか記載のポリペプチドを発現する細胞又は請求項16記載の細胞、及びHIV-1に感染していることが疑われる患者の血清、血球又は血液を混合してインキュベートを行う工程、及び

(b) 該細胞におけるHIV-1の局在性を分析する、又はHIV-1感染細胞と該細胞との融合性を測定する工程、  
を含んでなることを特徴とする、AIDS発症又はHIV-1感染を検出する方法。

(79)

CTCGGTGTCCTCTTGCTGTCCAGCTCTGCAGCCTCCGGCGCGCCCTCCCGCCACGCCATGGACGCCAAGGTCGTCCGCC  
MetAspAlaLysValValAla  
-----

GTGCTGGCCCTGGTGTGGCCGGCTCTGCATCAGTGACGGTAAACCAGTCAGCCTGAGCTACCGATGCCCTGCCCGGTTCC  
ValLeuAlaLeuValLeuAlaAlaLeuCysIleSerAspGlyLysProValSerLeuSerTyrArgCysProCysArgPhe  
-----

(241)

TTCGAGGCCACATCGCCAGAGCCAAACGTCAAGCATCTGAAAAATCCTCAACACTCCAAACTGTGCCCTTCAGATTGTTGCA  
PheGluSerHisIleAlaArgAlaAsnValLysHisLeuLysIleLeuAsnThrProAsnCysAlaLeuGlnIleValAla  
\*

CGGCTGAAGAACAAACAGACAAAGTGTGCAATTGACCCGAAATTAAAGTGGATCCAAGAGTACCTGGAGAAAGCTTTAAAC  
ArgLeuLysAsnAsnAsnArgGlnValCysIleAspProLysLeuLysTrpIleGlnGluTyrLeuGluLysAlaLeuAsn  
\*

(403)

AAGTAAGCACAAACAGCCCAAGGACTTTCCAGTAGACCCCCGAGGAAGGCTGACATCCGTGGGAGATGCCAAGGGCAGTGGT  
Lys

GGGAGGAGGGCCCTGAACCCCTGGCCAGGATGGCCGGCGGGACAGCAGTGGGGTTCATGCTAAGGTTTGCCAGCATAAA

GACACTCCGCCCATAGCATATGGTACGATATTGCAGCTTATATTATCCCTGCCCTCGCCCCGTGCACAAATGGAGCTTTTATA

ACTGGGGTTTTTCTAAGGAATTGTATTACCCCTAACCCAGTTAGCTTCATCCCCCATTTCTCCTCATCTTCATTTTAAAA

---

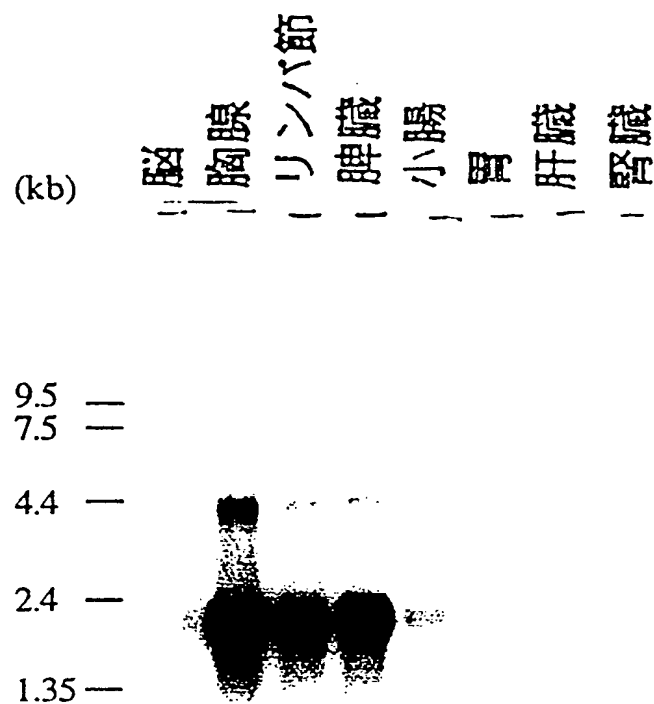
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

AAGCAGTGATTACTTCAAGGGCTGTATTTCAGTTTGGCTTCTCTTTGGCCCTGGGGCCCTCTGGGCCACAGTTATAGA  
 CGGTGGCTTTTGCAGGGAGCCCTAGAGAGAAACCTTCCACCAGAGCAGAGTCCGAGGAAACGCTGCAGGGCTTGTCTCTGCAGG  
 GGGCGCTCCTCGACAGATGCCCTTGTCTGAGTCAACACAAAGATCCGGCAGAGGGAGGCTCCTTTATCCAGTTCAGTGCCAG  
 GGTGGGAAGCTTCCITTAGAAGTGATCCCTGAAGCTGTGCTCAGAGACCCCTTTCCTAGCCGTTCCCTGCTCTCTGCTTGCC  
 TCCAAACGCATGCTTCACTGACTTCCGCTTCTCACCTCTGTAGCCTGACGGACCAATGCTGCAATGGAAGGGAGGAGAGT  
 (1051)  
 GATGTGGGTGCCCCCTCCTTCCCTTTTGCTTTCCTCTCACCTTGGGCCCTTTGTGAGATTTTCTTTGGCCCTCCTGT  
 AGAATGGAGCCAGACCATCCTGGATAATGTGAGAAACATGCCCTAGATTTACCCACAAACACAAGTCTGAGAAATTAATCATA  
 AACGGAAGTTTAAATGAGGATTTGGACCTTTGGTAATTGTCTCCCTGAGTCCCTATATATTTTCAACAGTGGCTCTATGGGCTCTG  
 ATCGAATATCAGTGTGAAAAATAATAATAATAATAAAGCAATAAGCCAGAAATCTTGCCATGAAGCCACAGTGGGGA  
 TTCTGGGTTCCTCAATCAGAAATGGAGACAAGATAAAACCTTGCCATACATTTCTTACGATCACAGACGGCCCTGGTGTCTTTGG  
 TAACTATTTTACAAGGCATTTTTTACATATATTTTTTGTGCACCTTTTTATGTTTCTTTTGGAAAGACAAATGTATTTTCAGAAAT  
 TATTTGTAGTCAATTCTATATATTTGAAGTGGAGCCATAGTAATGCCAGTAGATATCTCTATGATCTTTGAGCTACTGGCAAC  
 TTGTAAAGAAAATATATGACATATAAATGTATGTAGCTTTCCGGTGTACGCCACGGTGTATTTTTCCTACTTGGAAATGAA  
 (1699)  
 ATTGTATCAACTGTGACATTATATGCCTAGCAATAAAATGCTAAATGTTTTCATGCTGTAAAAAATAAAAAA

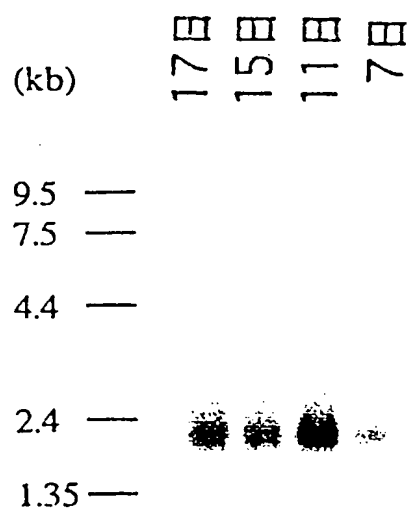
---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**A**



**B**



☒ 2

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## CHO細胞

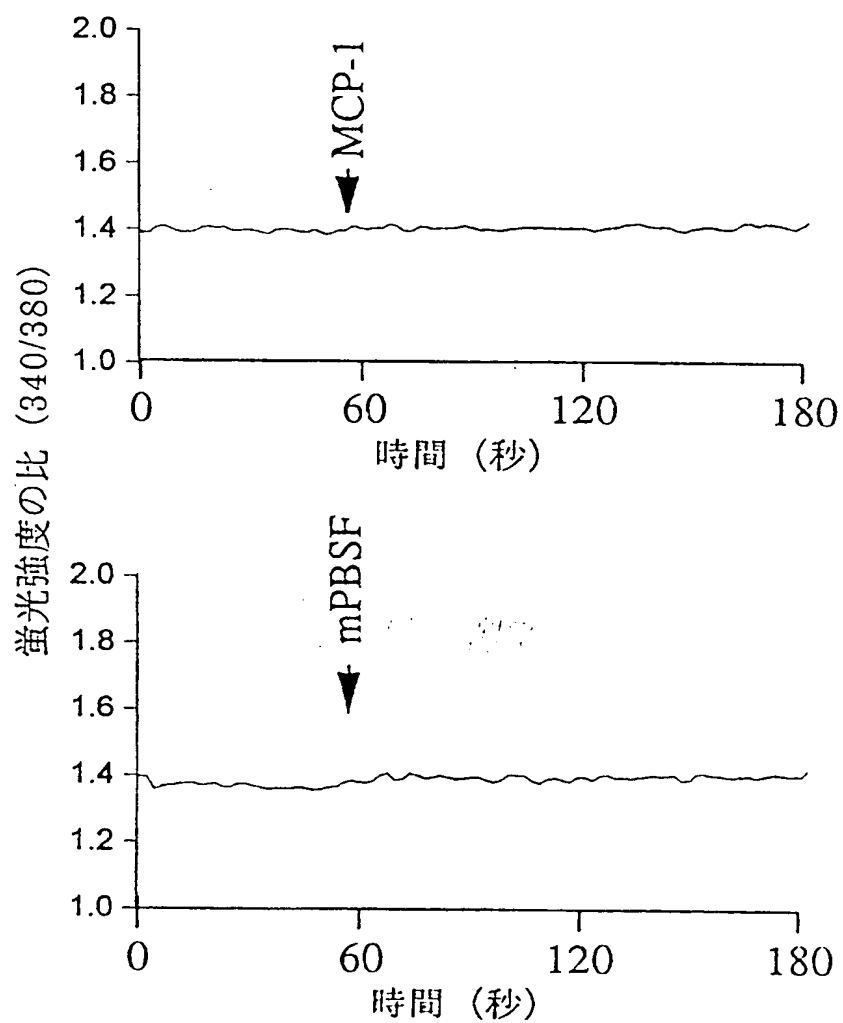


図 3

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## CHO細胞 (CC CKR2B+)

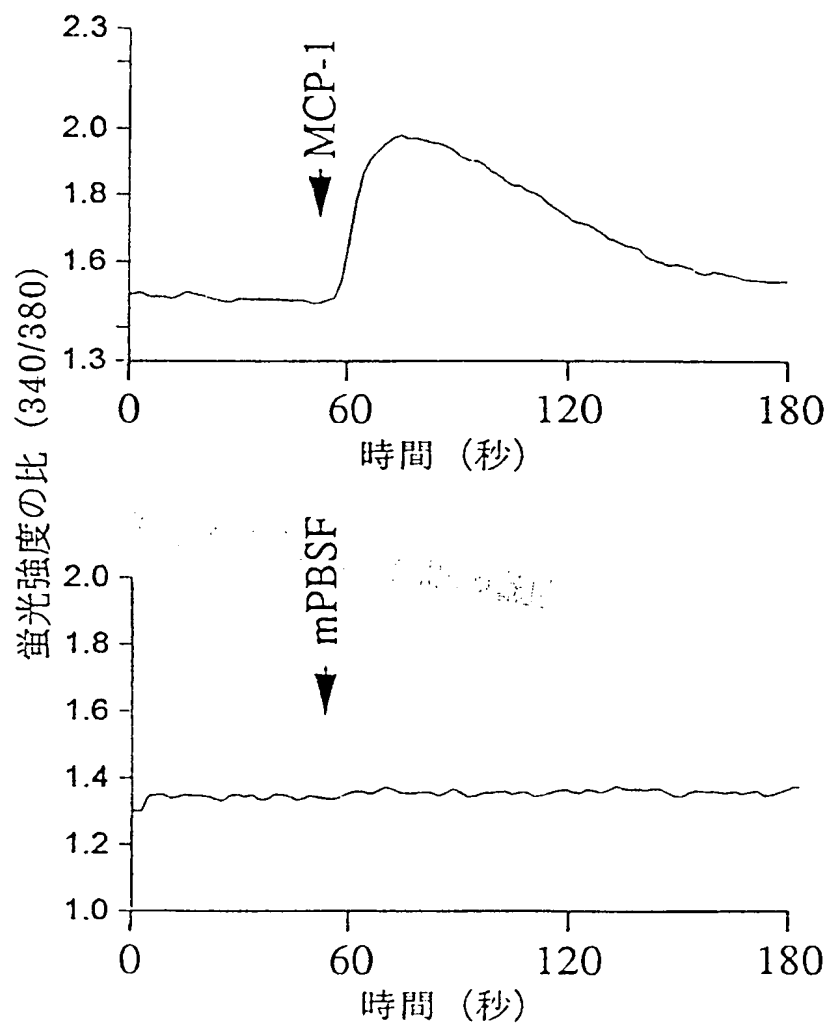


図 4

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

CHO細胞 (mPBSF/SDF-1R+)

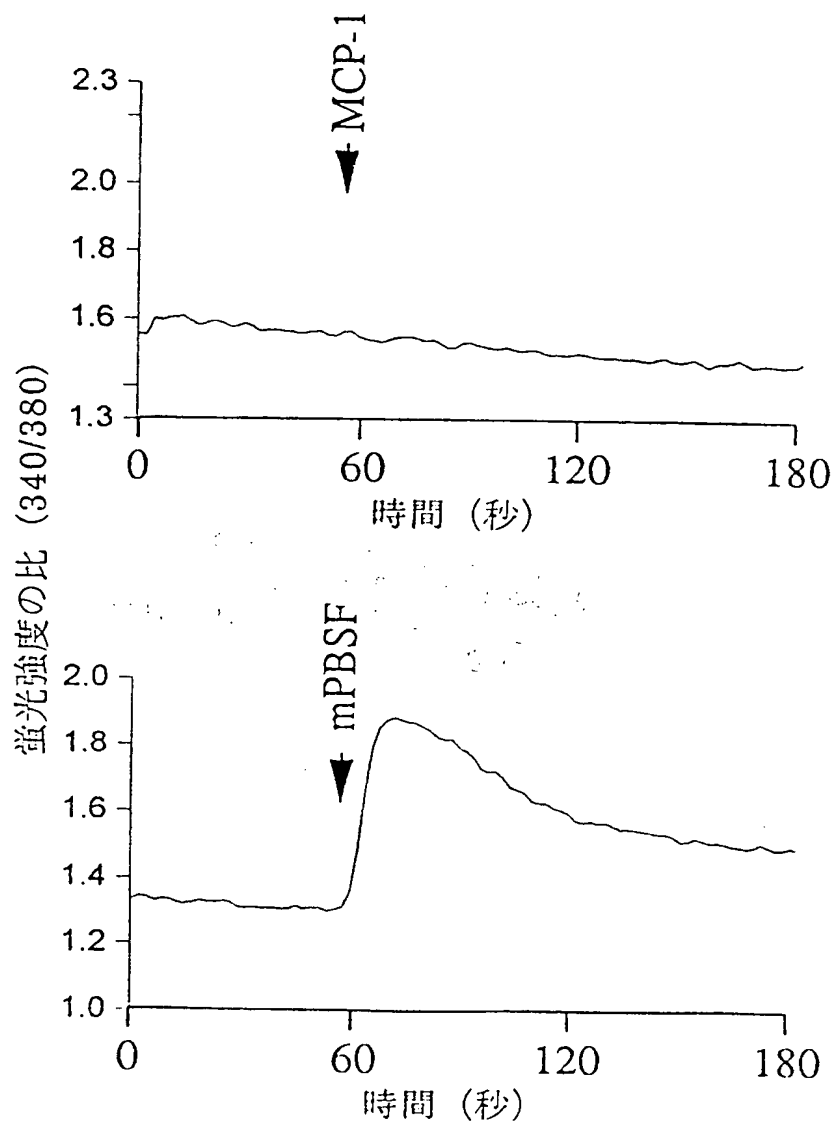


図 5

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

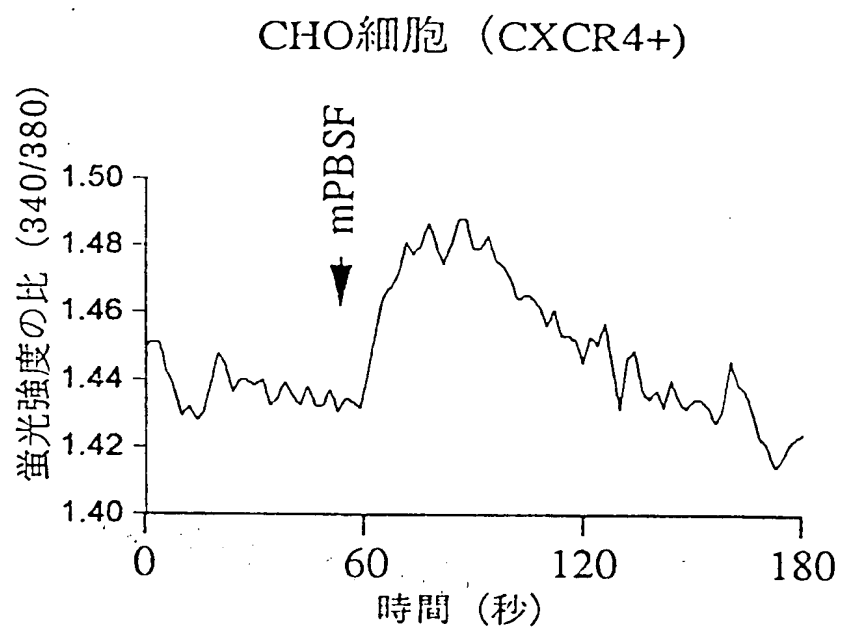


図 6

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## CHO細胞 (mPBSF/SDF-1R+)

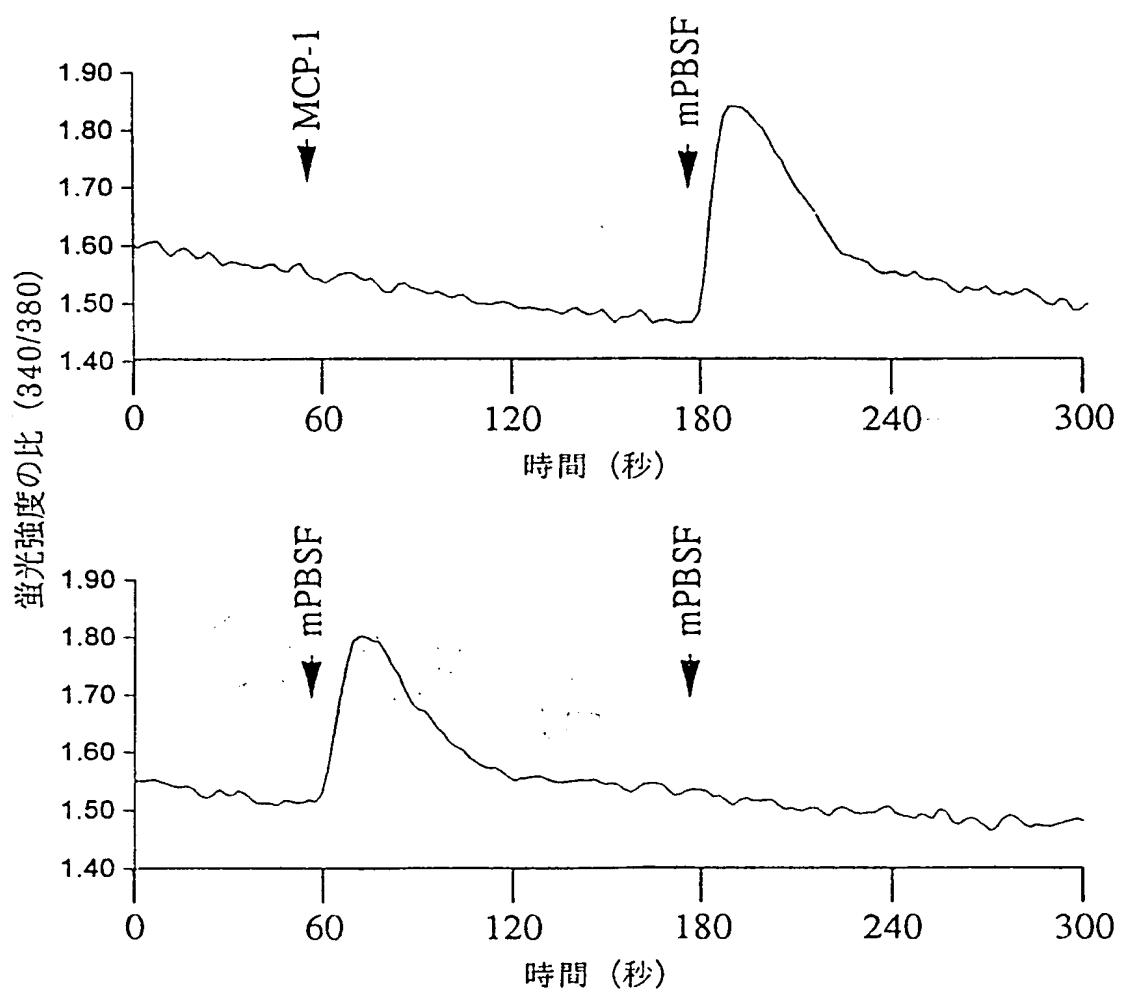
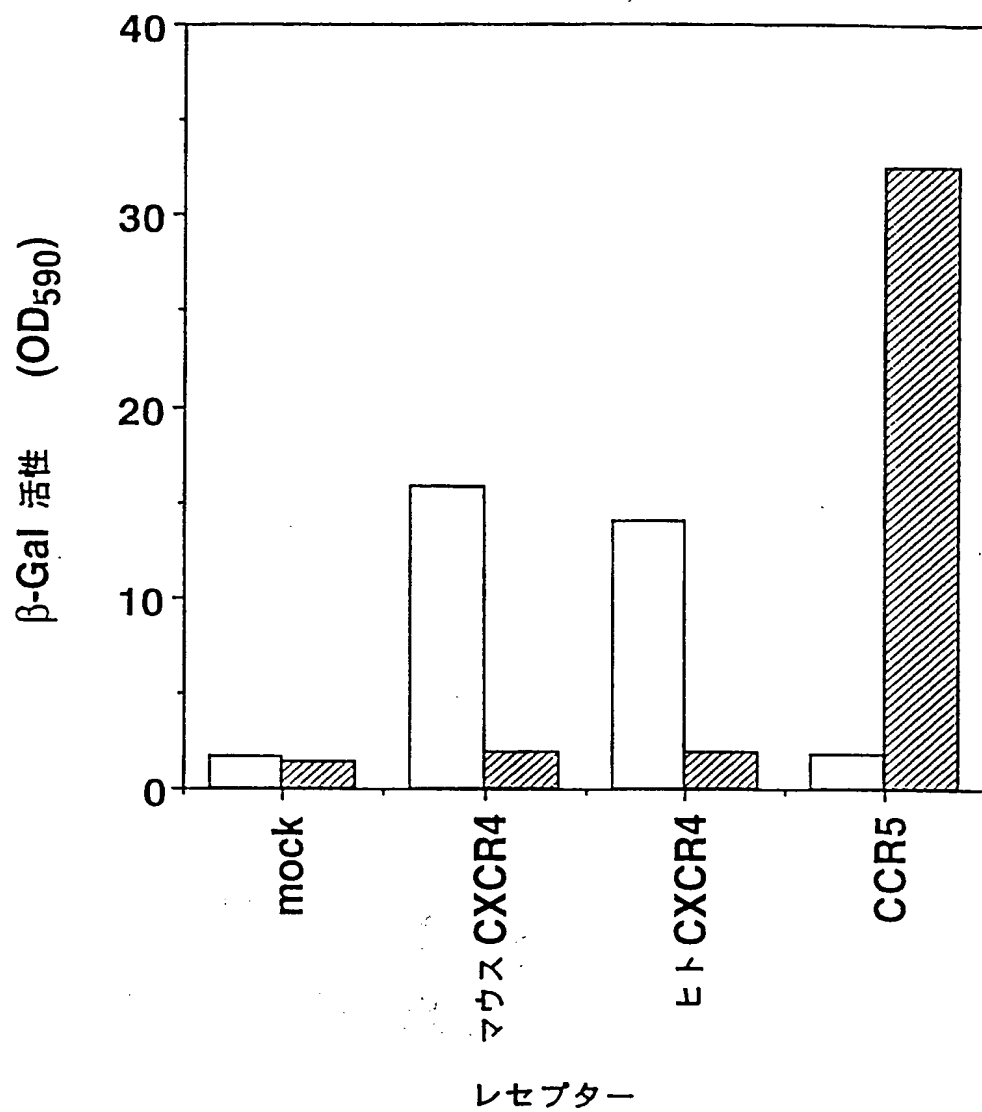


図 7

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



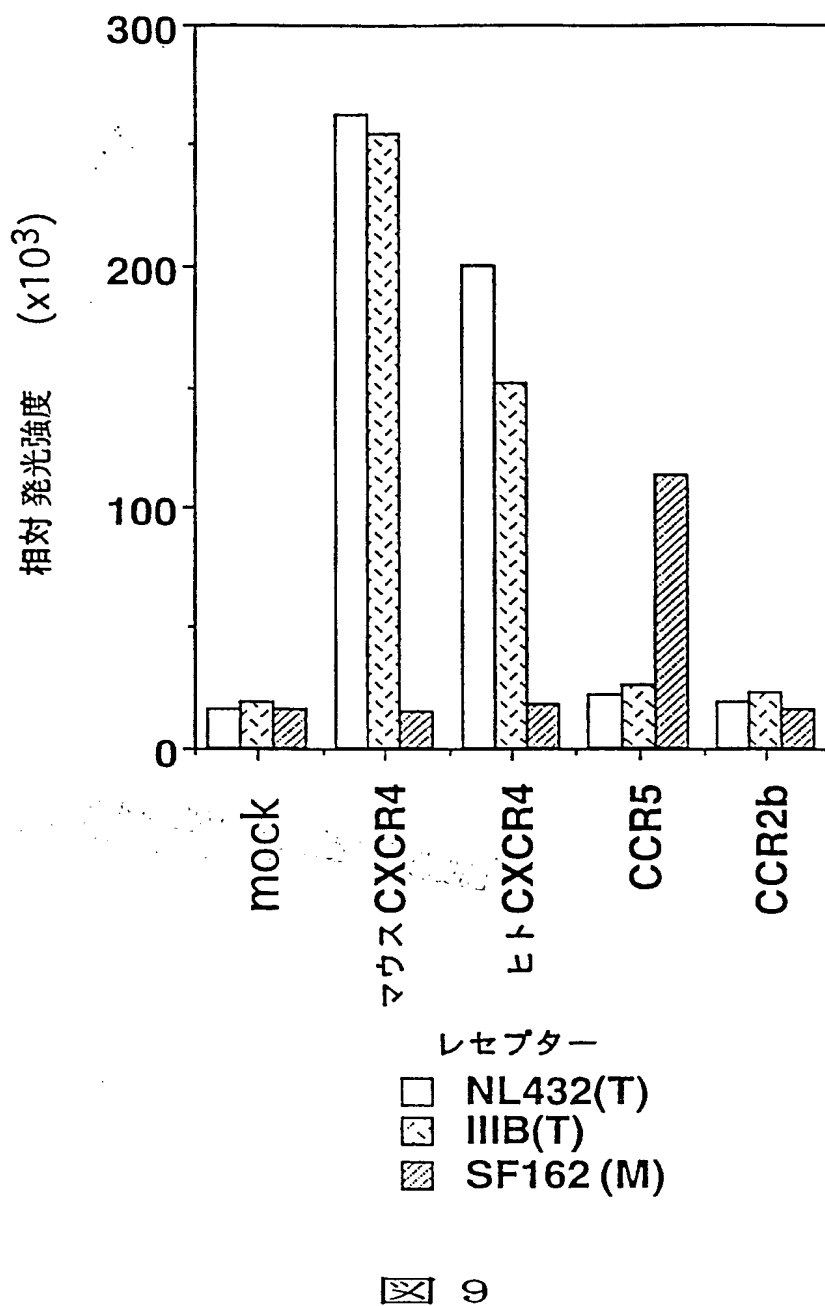
- Env (NL432)  
(T細胞株指向性株)
- ▨ Env (SF162)  
(マクロファージ指向性株)

図 8

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

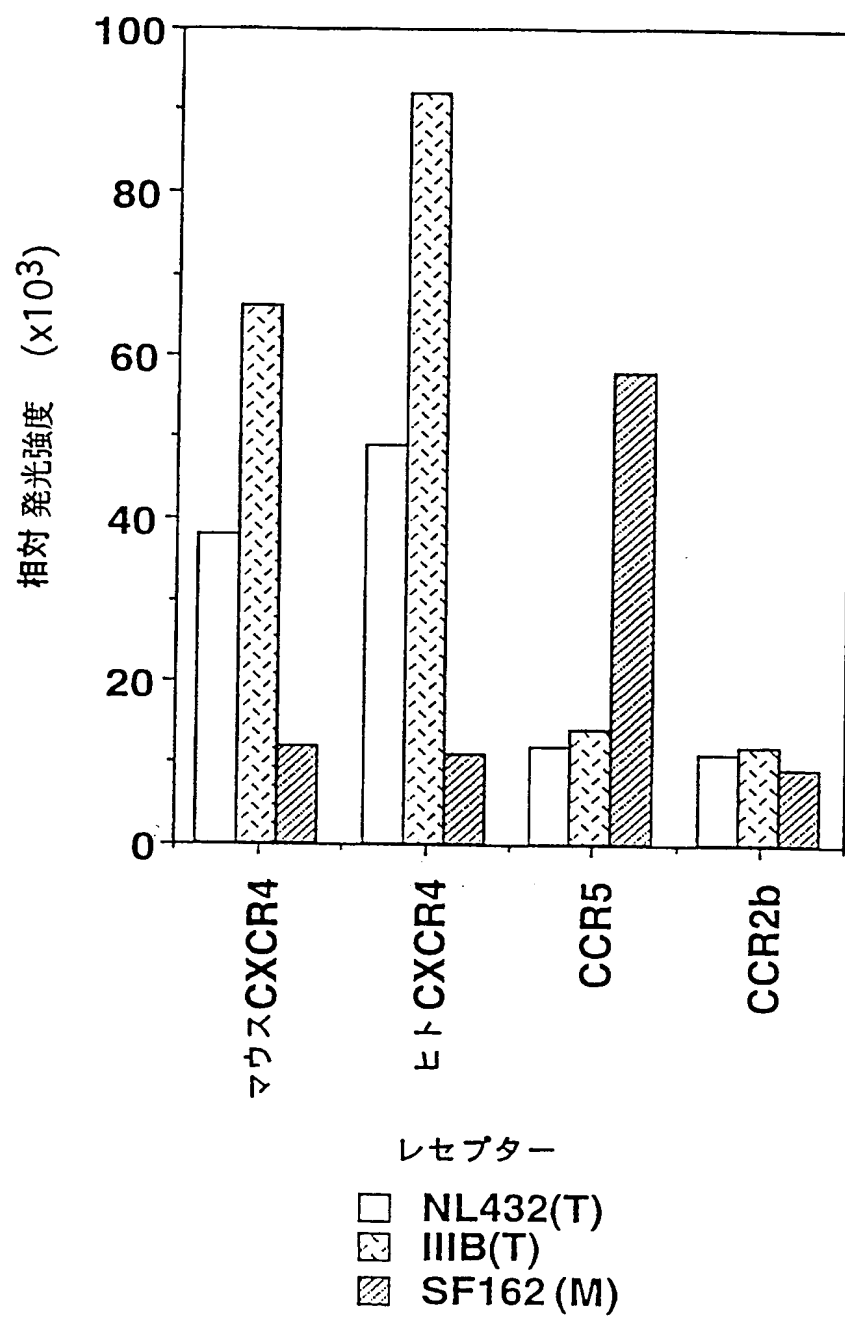
A



---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

B



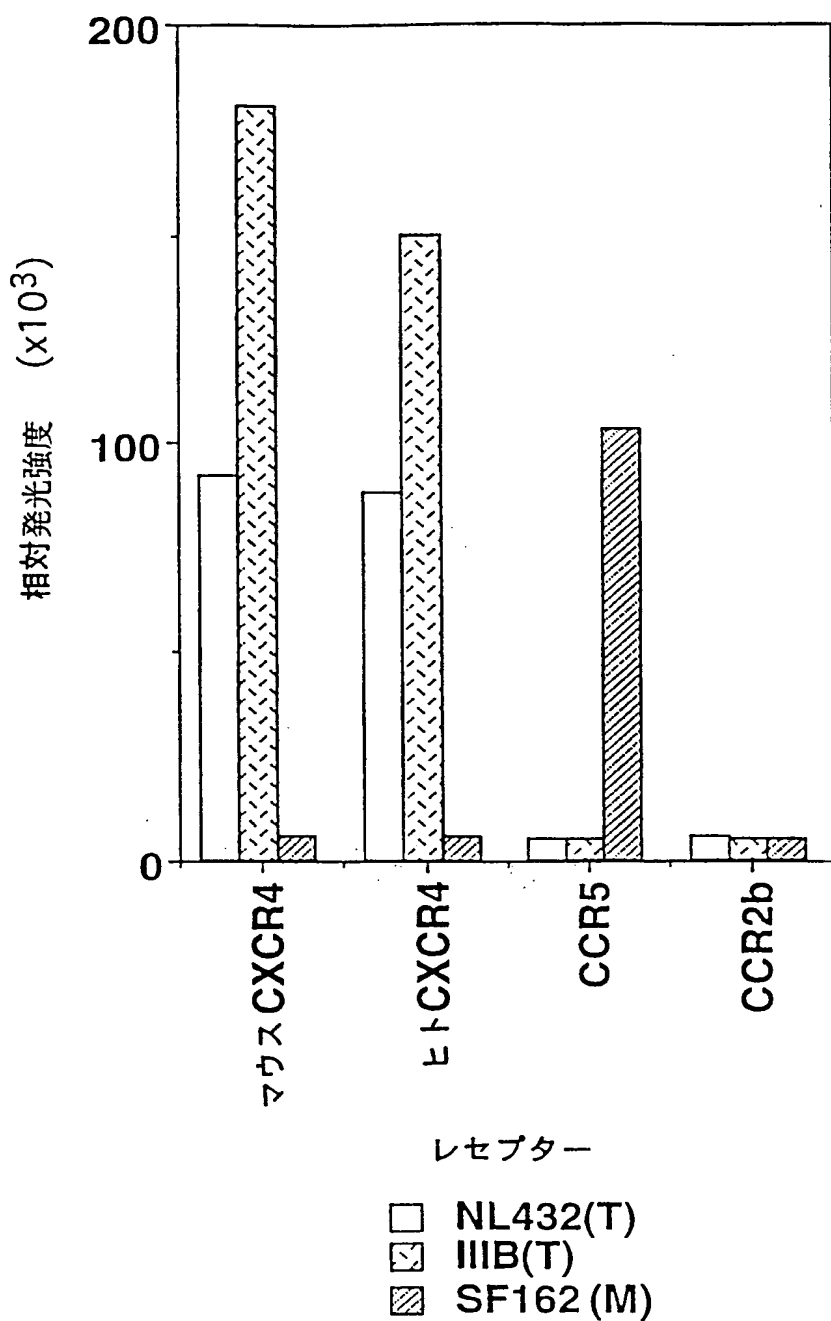
1 0

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



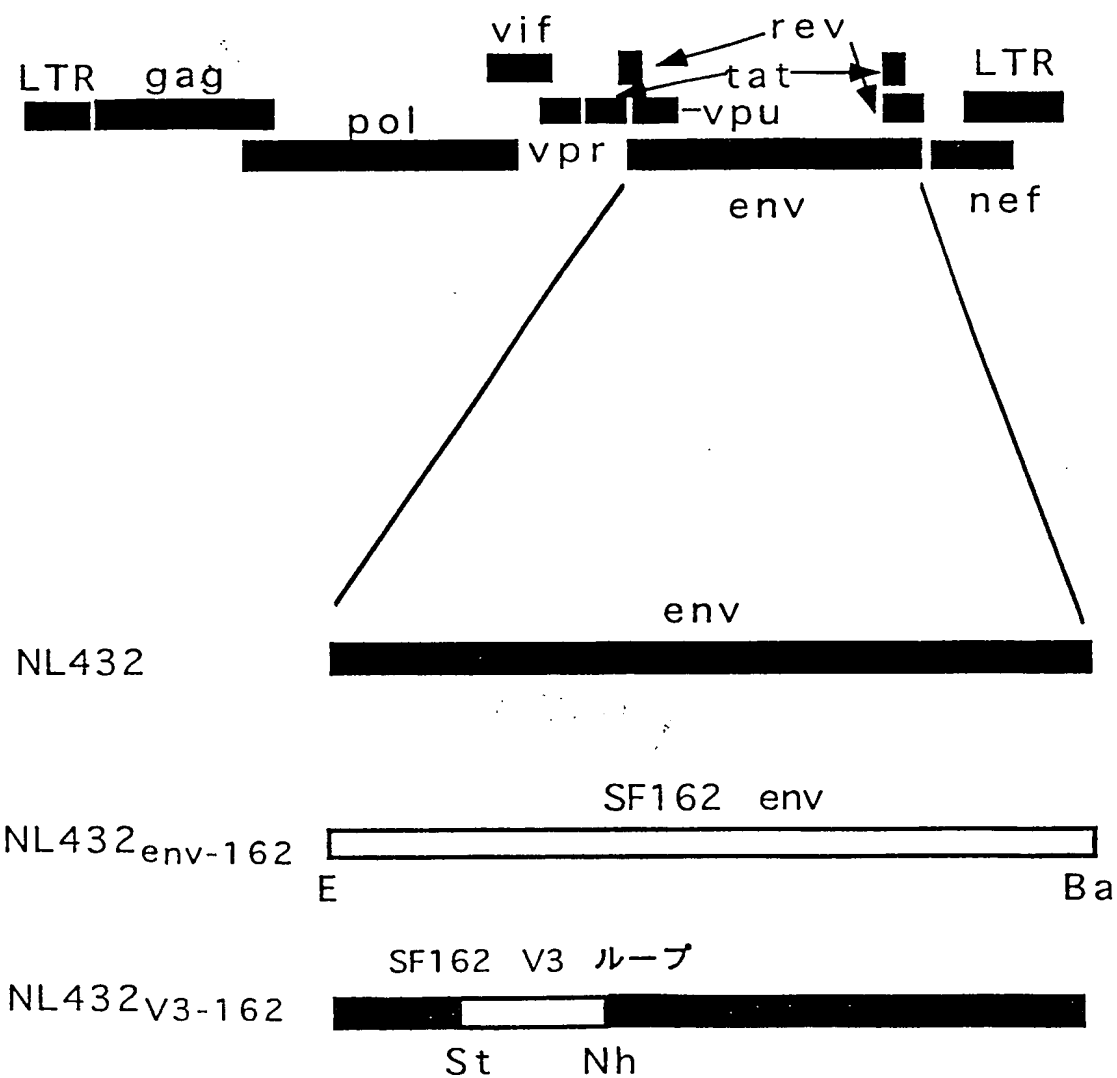
C



1 1

---

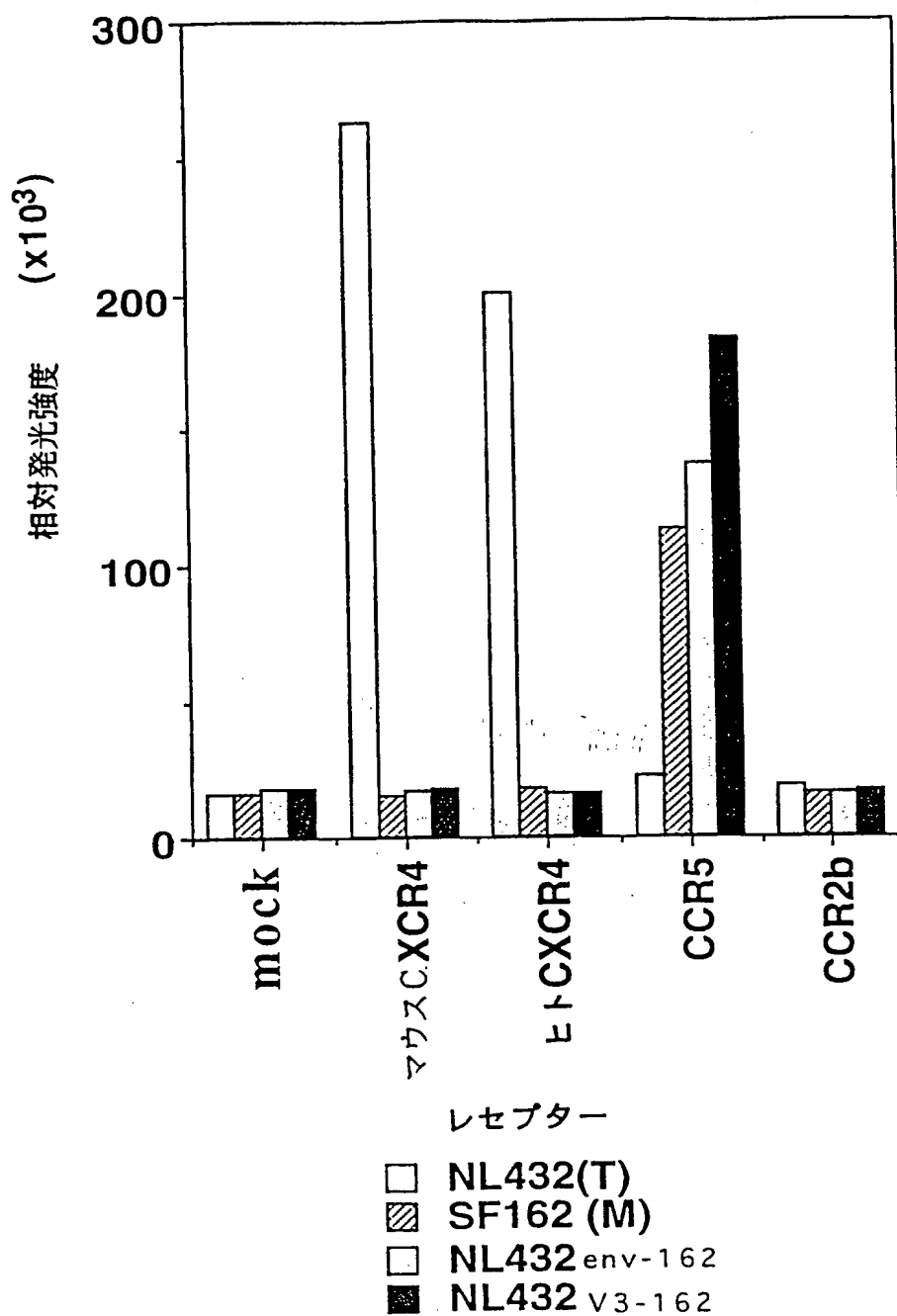
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



☒ 1 2

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



1 3

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00299

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/715, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08,  
C07K16/28, A61K38/18, A61K38/19, G01N33/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/715, C12N5/10, C12P21/02, C12P21/08,  
C07K16/28, A61K38/18, A61K38/19, G01N33/577

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS, WPI, BIOSIS PREVIEWS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Nagasawa Takashi et al., "Molecular Cloning and Characterization of a Murine Pre-B-Cell Growth-Stimulating Factor ..." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93(25), 14726-14729	1 - 23
X	Heesen Michael et al., "Cloning of the Mouse Fusin Gene, Homolog to a Human HIV-1 Co-Factor" J. Immunol., 1996, 157(12), 5455-5460	1 - 23

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
April 10, 1997 (10. 04. 97)Date of mailing of the international search report  
April 22, 1997 (22. 04. 97)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 15/12, C07K 14/715, C12N 5/10, C12P 21/02, C12P 21/08, C07K 16/28, A61K 38/18, A61K 38/19, G01N 33/577

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 15/12, C07K 14/715, C12N 5/10, C12P 21/02, C12P 21/08, C07K 16/28, A61K 38/18, A61K 38/19, G01N 33/577

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS, WPI, BIOSIS PREVIEWS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	NAGASAWA TAKASHI et al, 「MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A MURINE PRE-B-CELL GROWTH-STIMULATING FACTOR . . .」 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93 (25), 14726-14729	1-23
X	HEESEN MICHAEL et al, 「CLONING OF THE MOUSE FUSIN GENE, HOMOLOG TO A HUMAN HIV-1 CO-FACTOR」 J. Immunol., 1996, 157 (12), 5455-5460	1-23

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
10.04.97

国際調査報告の発送日  
22.04.97

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号100  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
新見 浩一 印  
4 B 9162  
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 13 August 1998 (13.08.98)	
International application No.: PCT/JP97/00299	Applicant's or agent's file reference: 97-016-PCT
International filing date: 07 February 1997 (07.02.97)	Priority date:
Applicant: KISHIMOTO, Tadimitsu et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
15 July 1998 (15.07.98)☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**